

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Microbiología III**



**BIOETANOL DE PAJA DE TRIGO: ESTRATEGIAS  
DE INTEGRACIÓN DE LAS ETAPAS DEL  
PROCESO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**M<sup>a</sup> Elia Tomás Pejó**

Bajo la dirección de los doctores

Mercedes Ballesteros  
José Miguel Oliva

**Madrid, 2010**

• ISBN: 978-84-693-4098-1 □ □

©M<sup>a</sup> Elia Tomás Pejó, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

BIOETANOL DE PAJA DE TRIGO:  
ESTRATEGIAS DE INTEGRACIÓN DE LAS  
ETAPAS DE PROCESO

M<sup>a</sup> Elia Tomás Pejó  
Madrid, 2009



Memoria presentada por M<sup>a</sup> Elia Tomás Pejó para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los doctores Mercedes Ballesteros y José Miguel Oliva.

Madrid, Septiembre de 2009.

Fdo: M<sup>a</sup> Elia Tomás Pejó

Fdo: Mercedes Ballesteros  
Investigadora del CIEMAT

Fdo: José Miguel Oliva  
Investigador del CIEMAT



Si es difícil plasmar en unas hojas todo el trabajo realizado durante cuatro años, más difícil todavía es dar las gracias en unas pocas líneas a todos aquellos que han hecho que la realización de este trabajo fuera una experiencia tan gratificante y enriquecedora.

En primer lugar quiero agradecerle a la Dra. Mercedes Ballesteros, responsable de la Unidad de Biomasa y codirectora de esta Tesis, su inestimable apoyo, su confianza y sus magníficos comentarios y correcciones. Muchas gracias por poner a mi alcance todos los medios para hacer de mis años de estudiante de doctorado una de las mejores etapas de mi vida.

También dar las gracias al Dr. José Miguel Oliva, codirector de la Tesis sin el que este trabajo no hubiera sido posible. Gracias Jose por implicarte tanto, por hacerme sentir en todo momento capaz de conseguir lo que me propusiera y por qué no, por cuidarme y ayudarme tanto, dentro y fuera del CIEMAT.

Quiero mostrar mi gratitud también a los demás Drs. de la Unidad; M<sup>a</sup> José Negro, Paloma Manzanares e Ignacio Ballesteros; a José María Martínez y Felicia Sáez, por sus ánimos, por estar siempre dispuestos a echar una mano y por todas las conversaciones “científicas” de las que me han hecho partícipe y de las que tanto he aprendido.

A la Dra. Maribel de Silóniz, profesora titular del departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, por su gran ayuda en los últimos días de preparación de esta Tesis.

A Pablo, Irene y Cristina. Gracias por las risas que me habéis regalado, por aguantar mi mal humor, por vuestra compañía y amistad. Habéis sido parte fundamental de esta historia y sabéis que sois y seréis siempre muy importantes para mí. Como no, a María, Sete, Antonio, Adela y Alberto, esa “Pandi” sin la que en ocasiones el trabajo hubiera sido mucho más duro de sobrellevar. Sois geniales.

Gracias a los demás compañeros, Pili, Olga, Jose Manuel, Jose Luis, Pedro, Chema y Mónica. También a Cristóbal y Encarna. Todos han puesto de una manera u otra su granito de arena y de todos ellos siempre me quedará un buen recuerdo.

A los becarios, los del 42 y demás departamentos, con los que tantos buenos ratos he pasado y espero seguir pasando. A los que sin ser compañeros de trabajo, me

han acompañado y ayudado durante esta etapa, ya sea desde el principio o en el último momento. Seguro que ellos se ven reflejados en estas líneas.

Thanks to professor Lisbeth Olsson. Thanks for making me feel my experience in Denmark and in Sweden unforgettable. Thanks for your comments and support, and for instilling me that Science is an amazing thing. I would also want to thank to all the people that I had the pleasure to work abroad; Eva, Valeria, Marta and many more. Mi experiencia en el extranjero no hubiera sido lo mismo sin Quka, Manolo, Jose y Manuel. Gracias chicos porque sin vuestra compañía y sin vuestra ayuda hubiese sido mucho más duro.

No me puedo olvidar de María y Leticia. Nenas, gracias por vuestra amistad, por ser mi familia de Madrid, por hacer que mi vida aquí sea tan fácil y porque aunque no sepáis pronunciar *Saccharomyces* me habéis apoyado siempre. No caben aquí todos los buenos momentos que hemos pasado y espero que nos queden muchos más por disfrutar. También a Marta y Laura, gracias a todas de corazón.

Als meus amics de L'Alcora i Castelló perquè encara que no sàpiguen ben bè el que faig sempre m'han fet sentir que el que estava fent era important, sempre m'han entés i recolzat, i m'han ajudat a oblidar en moltes ocasions els no tants bons moments que he passat amb la feina. Sense vosaltres tampoc haguera sigut possible.

Per últim és moment d'agrair als meus pares. Gràcies per l'ajuda, pels ànims i per tot el que m'haveu donat. Encara recorde el moment en que ma mare em va dir que sempre havia cregut que arribaria a ser doctora. Ara eixe moment està més a prop. Gràcies a Pilar, per ser com és i per saber que a la seva manera sempre està ahí. Sou el més gran que tinc.

*Als meus pares*  
*A Pilar*



ABREVIATURAS .....	i
<b>1. RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. OBJETO E INTERÉS DEL TEMA.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Biomasa energética.....	11
2.1.2. Biocombustibles para el transporte.....	12
2.1.2.1. Contexto histórico .....	13
<b>2.2. ETANOL LIGNOCELULÓSICO .....</b>	<b>15</b>
2.2.1. Composición de la biomasa lignocelulósica.....	16
2.2.1.1. Celulosa.....	17
2.2.1.2. Hemicelulosa.....	19
2.2.1.3. Lignina .....	20
2.2.2. Proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica.....	23
2.2.2.1. Pretratamiento .....	24
2.2.2.1.1. <i>Pretratamiento de explosión por vapor</i> .....	26
2.2.2.1.2. <i>Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento</i> .....	28
2.2.2.2. Hidrólisis enzimática.....	30
2.2.2.3. Fermentación.....	33
2.2.2.3.1. <i>Fermentación de la xilosa</i> .....	34
<b>2.3. INTEGRACIÓN DE LAS ETAPAS DE PROCESO .....</b>	<b>38</b>
2.3.1. Hidrólisis y fermentación separadas.....	41
2.3.2. Sacarificación y fermentación simultáneas .....	41
2.3.3. Sacarificación y cofermentación simultáneas.....	44
2.3.4. Bioproceso consolidado.....	45
<b>3. OBJETIVO E HIPÓTESIS .....</b>	<b>49</b>

<b>4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. COMPOSICIÓN DEL MATERIAL .....</b>	<b>58</b>
4.1.1. Efecto del pretratamiento en la composición del material pretratado .....	61
<b>4.2. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS .....</b>	<b>66</b>
<b>4.3. SACARIFICACIÓN Y COFERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS .....</b>	<b>74</b>
4.3.1. Cofermentación de la glucosa y la xilosa en los prehidrolizados.....	76
4.3.2. Procesos de SCFS a partir del RSI .....	78
4.3.3. Procesos de SFS y SCFS a partir del material pretratado completo.....	80
<b>4.4. COMPARACIÓN DEL PROCESO DE HFS Y SFS/SCFS .....</b>	<b>83</b>
<b>4.5. OBTENCIÓN DE UNA LEVADURA CON ELEVADA TOLERANCIA A LOS TÓXICOS Y EFICIENTE CONSUMO DE XILOSA .....</b>	<b>87</b>
4.5.1. Pruebas de fermentabilidad de los prehidrolizados .....	88
4.5.2. Empleo de la cepa adaptada de <i>S. cerevisiae</i> F12 en procesos de SCFS en semicontinuo con el MPC .....	95
<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>99</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>105</b>

## **ABREVIATURAS**



**ABREVIATURAS**

- ACL: agua caliente en fase líquida
- ACV: análisis del ciclo de vida
- ADH: alcohol deshidrogenasa
- AFEX: del inglés, “Ammonia Fibre Explosion”
- BG:  $\beta$ -glucosidasa
- BPC: bioproceso consolidado
- CBH: celobiohidrolasa
- CECT: colección española de cultivos tipo
- CIEMAT: Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas
- DOE: del inglés, “Department Of Energy”
- EG: endoglucanasa
- ETBE: etil ter-butyl éter
- EV: explosión por vapor
- EX: exoglucanasa
- FAOSTAT: del inglés, “Food and Agricultural Organization Statistics”
- HE: hidrólisis enzimática
- HFS: hidrólisis y fermentación por separado
- HMF: 5-hidroximetilfurfural
- HPLC: del inglés, “High Liquid Performance Chromatography”
- LAP: del inglés, “Laboratory Analytical Procedure”
- MEB: microscopía electrónica de barrido
- MFA: microscopía de fuerza atómica
- MPC: material pretratado completo
- Mtep: toneladas métricas equivalentes de petróleo
- NREL: del inglés, “National Renewable Energy Laboratory”
- OPEP: Organización de los Países Exportadores de Petróleo
- p/p: relación peso/peso
- p/v: relación peso/volumen

- PDC: piruvato descarboxilasa
- PER: Plan de Energías Renovables
- r.p.m.: revoluciones por minuto
- RSI: residuo sólido insoluble
- SFS: sacarificación y fermentación simultáneas
- SCFS: sacarificación y cofermentación simultáneas
- UE: Unión Europea
- UI: unidades internacionales
- UFC: unidades formadoras de colonias
- UPF: unidades de papel de filtro
- v/v: relación volumen/volumen
- XDH: xilitol deshidrogenasa
- XI: xilosa isomerasa
- XK: xilulokinasa
- XR: xilosa reductasa

# **1. RESUMEN/ABSTRACT**



## 1. RESUMEN

La disminución de las reservas de petróleo junto con el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) ha dado lugar a un creciente interés en la producción y utilización de combustibles alternativos a los actuales combustibles fósiles. Los biocombustibles líquidos (bioetanol y biodiésel), obtenidos a partir de biomasa, son los únicos productos renovables que pueden integrarse fácilmente en los actuales sistemas de distribución y son una de las pocas alternativas de diversificación del sector transporte a corto plazo. Por todo ello, los biocombustibles son una prioridad en la política energética de la Unión Europea dirigida a asegurar el suministro energético y reducir las emisiones de GEI.

En la actualidad, para producir bioetanol a escala industrial se emplea biomasa amilácea o azucarada como materia prima lo que ha derivado en un intenso debate sobre su sostenibilidad. En este contexto, el bioetanol producido a partir de biomasa lignocelulósica se muestra como una alternativa interesante ya que estas materias primas se encuentran ampliamente distribuidas, no compiten con el mercado alimentario y son más baratas que los recursos agrícolas convencionales. Además, el bioetanol lignocelulósico supone una gran ventaja respecto a las emisiones de GEI puesto que implica una mayor reducción neta de emisiones de CO<sub>2</sub> en comparación con los biocombustibles provenientes de materias amiláceas o azucaradas.

En los últimos años, se han estudiado diferentes tecnologías para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, siendo los bioprocesos basados en hidrólisis enzimática los que se muestran como la opción más prometedora. El éxito del desarrollo comercial del etanol a partir de lignocelulosa requiere de una simplificación del proceso con una integración de todos los pasos. Esta integración de proceso implica tener una visión global del pretratamiento, hidrólisis y fermentación ya que cada uno de estos pasos tiene una gran repercusión en el siguiente.

La presente Tesis Doctoral aborda el hecho de la integración de las etapas de proceso mediante el estudio de diferentes configuraciones para la producción de etanol a

partir de paja de trigo. La producción máxima de etanol, así como los rendimientos y las productividades volumétricas han sido comparadas empleando diferentes estrategias de hidrólisis y fermentación separadas (HFS), sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS) con diferentes cepas de levaduras etanológicas: *Saccharomyces cerevisiae* Red Star, *S. cerevisiae* F12 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Además, también se han llevado a cabo diferentes procesos de SFS y de SCFS en semicontinuo (con adición de sustrato por pulsos).

La explosión por vapor ha sido la tecnología elegida para pretratar la paja de trigo ya que, da lugar a una alta recuperación de azúcares y a un aumento de la digestibilidad de la celulosa. Sin embargo, durante el pretratamiento también se produce la descomposición parcial de la hemicelulosa y a la generación de compuestos tóxicos, derivados de la degradación de los azúcares y la lignina, lo que puede afectar las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación. Por ello, tras esta etapa se suele realizar la filtración del material pretratado con la consiguiente obtención de dos fracciones: una fracción sólida o residuo sólido insoluble (RSI) rica en celulosa y lignina y una fracción líquida o prehidrolizado rica en azúcares hemicelulósicos y productos inhibidores.

Tras el pretratamiento, llevar a cabo una SFS en lugar de HFS debe considerarse como la mejor opción en un proceso de producción de etanol. La SFS reduce el tiempo total del proceso y permite obtener mejores rendimientos debido a que se minimiza la inhibición por producto final sobre la actividad enzimática. Además, al emplear la fracción lavada del residuo sólido insoluble (RSI) en una SFS a 42 °C con *K. marxianus* CECT 10875 se obtuvieron concentraciones mayores de etanol que las obtenidas en la SFS a 32 °C con *S. cerevisiae* Red Star. Esto se debe a que *K. marxianus* puede crecer y fermentar a temperaturas por encima de 40 °C, más cercanas a la temperatura óptima para las celulasas empleadas en la hidrólisis, dando como resultado mayores productividades volumétricas y mayores rendimientos de hidrólisis y etanol. Sin embargo, este microorganismo presenta la incapacidad de fermentar pentosas.

Por ello, cuando se dispone de levaduras modificadas genéticamente como *S. cerevisiae* F12, capaces de fermentar la xilosa, el mayor nivel de integración de proceso se alcanza al emplear el material pretratado completo en un proceso de SCFS. La

realización de una SCFS con *S. cerevisiae* F12 supuso un incremento del 30% en la producción final de etanol en comparación con un proceso de SFS con *S. cerevisiae* Red Star. Además, la concentración de etanol obtenida en un proceso de SCFS con el material pretratado completo fue mayor que la alcanzada en la SCFS del residuo sólido insoluble y la fermentación del prehidrolizado por separado.

Con objeto de mejorar el consumo de azúcares y aumentar la tolerancia a los tóxicos, se sometió a la cepa recombinante *S. cerevisiae* F12 a un proceso de ingeniería evolutiva mediante la adaptación a prehidrolizados de paja de trigo con concentración creciente de inhibidores. El éxito de la ingeniería evolutiva se basa en la posibilidad de seleccionar a las células con propiedades ventajosas bajo condiciones que reflejan las características de un proceso industrial. Dicha adaptación dio como resultado una población con mayor tolerancia a los inhibidores y mayor tasa de consumo de azúcares.

Las ventajas de realizar los procesos en semicontinuo se observaron tanto en la SFS como en la SCFS. Al emplear *K. marxianus* CECT 10875 se alcanzó una concentración de etanol de 36,2 g/l en un proceso de SFS a 42 °C en semicontinuo, la cual se encuentra muy cercana al que se considera punto de referencia para una destilación económicamente viable (4% p/p). En un proceso de SCFS con la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12, la configuración en semicontinuo favoreció significativamente la cofermentación de la glucosa y la xilosa aumentándose así los rendimientos de etanol sobre azúcares consumidos.

El mayor nivel de integración de proceso se obtuvo al emplear el material pretratado completo en una SCFS con la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12. A pesar del incremento en el rendimiento de etanol que supuso la utilización de una cepa cofermentadora de glucosa y xilosa en un proceso semicontinuo y adaptada a los tóxicos, no se consiguieron superar los resultados obtenidos en un proceso de SFS en semicontinuo a 42 °C con *K. marxianus* CECT 10875 a partir del RSI lavado. Por ello, es necesario continuar con las investigaciones para obtener cepas recombinantes más robustas y resistentes a los inhibidores generados durante el pretratamiento que presenten buenas capacidades fermentativas.

### **ABSTRACT**

The depletion of world's petroleum supply as well as greenhouse gas (GHG) effect have resulted in an increasing interest in alternative fuels. Biofuels, which are obtained from biomass, are the only renewable products that can be easily integrated into current fuel distribution systems, and one of the few alternatives for short-term diversification in the transportation sector. Due to that, they represent a top priority in the European Union energy policies intended to enhance energy security and reduce GHG emissions.

Current production of ethanol relies on bioethanol from starch and sugars, but there has been considerable debate about its sustainability. In this context, bioethanol produced from lignocellulosic biomass is an interesting alternative since lignocellulosic raw materials are much widely distributed, do not compete with food crops and they are also less expensive than conventional agricultural feedstocks. Furthermore, bioethanol from lignocellulose shows a remarkable advantage regarding GHG emissions since it implies higher net CO<sub>2</sub> reduction in comparison to biofuels from sugar or starch.

In the last years, numerous improvements have been made on lignocellulosic technologies for ethanol production, being the bioprocesses based on enzymatic hydrolysis the most promising alternatives. Among all improvements needed to move forward the implementation of the ethanol production process at industrial scale, the simplification of the process with integration of all the stages offers the best prospects. The integration of the steps implies to have an overall picture of pretreatment, hydrolysis and fermentation because each stage has an important impact on the following. This integration could have benefits in terms of lower capital and operating costs.

The present Doctoral Thesis addresses the process integration issue by studying different process strategies for ethanol production from wheat straw. Maximum ethanol concentration as well as ethanol yield and productivity have been compared using different process configurations such as separate hydrolysis and fermentation (SHF), simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and simultaneous saccharification

and co-fermentation (SSCF) and several ethanologenic yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* Red Star, *S. cerevisiae* F12 and *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Furthermore, fed-batch approaches have been used in SSF as well as in SSCF processes.

Steam explosion has been chosen as the method for pretreating wheat straw since it results in both high sugar recovery and an improved digestibility of cellulose. However, pretreatment leads to a partial hemicellulose decomposition and the generation of toxic compounds, derived from sugar degradation and lignin, solubilization that could affect the subsequent hydrolysis and fermentation steps. Due to that, the pretreated material or slurry is usually filtered in order to obtain two fractions: the water insoluble solid fraction (WIS), rich in cellulose and lignin, and the prehydrolysate rich in hemicellulosic sugars and toxic compounds.

After pretreatment, performing SSF instead of SHF should be considered the best option in an ethanol production process. SSF reduces the total duration of the process and allows higher overall yields due to the minimization of the end-product inhibition on enzyme activity. Furthermore, SSF at 42 °C with washed water insoluble solids (WIS) fraction of steam-exploded wheat straw with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 resulted in higher ethanol concentration when comparing to an SSF process at 32 °C with *Saccharomyces cerevisiae* Red Star. *K. marxianus* can grow and ferment at temperatures above 40 °C, closer to the optimum for the cellulases employed for hydrolysis, so resulting in higher saccharification and ethanol yields and volumetric productivities. However, *K. marxianus* is unable to ferment pentoses.

When an engineered xylose fermenting yeast such as *S. cerevisiae* F12 is available, the highest level of process integration is reached when employing the whole slurry in an SSCF process. About 30% more ethanol than the produced in an SSF was obtained in an SSCF process with *S. cerevisiae* F12 in comparison to conventional strain. Moreover, higher ethanol concentration was obtained in SSCF with the whole slurry (prehydrolysate and WIS fraction) in comparison to an SSCF of the WIS fraction and fermentation of the prehydrolysate separately.

Directed evolution was employed as an adaptation strategy for improving sugar consumption and enhancing the tolerance to the toxic compounds. The power of

continuous evolution is based on its effectiveness in producing the desired effects and the possibility to select cells with advantageous properties under conditions that reflect the characteristics of an industrial process. Adaptation of the recombinant xylose-fermenting *S. cerevisiae* F12 to wheat straw prehydrolysates, with increasing concentration of inhibitors, resulted in an evolved population with higher inhibitor tolerance and higher sugar consumption rates.

Advantages of applying fed-batch mode were observed in SSF processes as well as SSCF. Fed-batch processes resulted in higher ethanol yields and productivities when comparing to batch SSF/SSCF. *K. marxianus* CECT 10875 produced an ethanol concentration as high as 36.2 g/L of ethanol in fed-batch SSF, which is close to the benchmark for an economically viable distillation (4% w/w). In case of SSCF with adapted *S. cerevisiae* F12, fed-batch strategy favoured significantly xylose and glucose co-fermentation, so increasing the ethanol yield on consumed sugars.

The highest level of process integration was reached using the whole slurry in an SSCF process with the adapted *S. cerevisiae* F12 strain. In spite of enhancing the ethanol yield when performing fed-batch SCFS with xylose fermenting yeast adapted to the toxic compounds, it was not possible to exceed the maximum ethanol concentration (36.2 g/L) and yield (0.33 g/g) obtained in a fed-batch SSF process at 42 °C with washed WIS and *K. marxianus* CECT 10875. Therefore, it is still needed to progress on obtaining robust recombinant strains presenting good fermenting capacities and high resistance to inhibitors released during pretreatment.

## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2. INTRODUCCIÓN

### *2.1. OBJETO E INTERÉS DEL TEMA*

#### **2.1.1. Biomasa energética**

La utilización de fuentes de energía renovables contribuye a disminuir la dependencia energética y ayuda a la diversificación de las fuentes de energía. Las energías renovables no se agotan, no generan residuos de difícil tratamiento y reducen las emisiones de gases causantes del efecto invernadero. La biomasa es una fuente de energía clave para el cumplimiento de los objetivos de utilización de energías renovables, tanto a nivel español como europeo. Además, la biomasa presenta beneficios añadidos ya que permite un cierto grado de almacenamiento, constituye una alternativa realista para la sustitución de los combustibles fósiles en el sector transporte a corto y medio plazo, favorece el mantenimiento y desarrollo del sector agrícola y forestal y genera beneficios adicionales en el caso de la valorización energética de residuos.

El término biomasa hace referencia a toda materia orgánica originada de forma inmediata en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. La biomasa abarca un amplio rango de materias orgánicas que se caracterizan por su heterogeneidad. Esta heterogeneidad hace difícil disponer, en muchos casos, de una base fiable de la disponibilidad global del recurso. La biomasa ha sido desde siempre la mayor fuente de energía para el ser humano y se ha estimado que actualmente contribuye entre un 10% y 14% al abastecimiento de la energía mundial (Mc Kendry, 2002).

Dentro de los objetivos fijados por la Unión Europea para el 2010 se ha establecido una participación de los biocarburantes en un 5,75% dentro del sector transporte (Directiva 2003/30/CE). En España, el Plan de Energías Renovables (PER) para el período 2005-2010 (PER, 2005) establece que el uso de biocarburantes en el

2010 sea del 5,83%, ligeramente superior que el objetivo fijado por la Directiva Europea. Además, el PER (2005-2010) plantea que la biomasa suponga en 2010 un 60% de la aportación del total de las energías renovables (12,1%). Para el 2020, la nueva Directiva de la UE (Directiva 2009/28/CE) relativa al fomento y uso de energía procedente de fuentes renovables, establece una participación de las energías renovables en un 20% al consumo de energía primaria. Asimismo, establece la participación de los biocombustibles y otros carburantes renovables en un 10% dentro del sector transporte.

### **2.1.2. Biocombustibles para el transporte**

La quema de combustibles fósiles para la generación de calor o energía representa la mayor fuente de emisiones de carbono antropogénicas, siendo los combustibles líquidos los responsables del 30% de las emisiones en los países industrializados (Gómez y col., 2008). Por ello, la sustitución de dichos combustibles por fuentes renovables se ha convertido en un claro objetivo político, tanto en economías desarrolladas como en vías de desarrollo.

Actualmente, aproximadamente el 98% de los combustibles para el transporte provienen del petróleo con las consiguientes consecuencias negativas en términos de seguridad de suministro y emisiones de CO<sub>2</sub> (Gómez y col., 2008). Así pues, en los últimos años ha habido un creciente interés por la producción y el uso de biocombustibles líquidos, ya sea biodiésel (producido a partir de aceites vegetales, animales o grasas) o bioetanol (producido mediante fermentación de azúcares).

Los biocombustibles para el transporte tienen generalmente un balance energético positivo, ya que la cantidad de energía contenida en el producto es superior a la requerida para su producción y distribución (Lechón y col., 2005). Los biocombustibles emiten, en principio, menos CO<sub>2</sub> porque están producidos por un ciclo del carbono a corto plazo y su combustión sólo devuelve a la atmósfera el CO<sub>2</sub> que la planta ha fijado para su crecimiento (Gómez y col., 2008). Estudios del Análisis del Ciclo de Vida (ACV) consideran una reducción de las emisiones de entre el 30% y el 50% con respecto a los combustibles fósiles para los biocarburantes producidos con las

tecnologías convencionales a partir de grano de cereal y aceites vegetales. No obstante, se prevén reducciones del 80-90% en el caso de los biocombustibles producidos a partir de biomasa lignocelulósica (Bio Plat, 2009).

En la actualidad, el bioetanol es un producto sustitutivo de la gasolina que se emplea como combustible único (E100), mezclado con ésta en distintas proporciones o como aditivo de la misma a través de su transformación a etil ter-butil éter (ETBE). El ETBE, que se obtiene a partir de una reacción química entre el etanol y el isobuteno, se encuentra actualmente en todas las gasolinas españolas como aditivo oxigenado y en la Unión Europea se acepta la incorporación del ETBE como mejorante de gasolinas hasta un porcentaje del 10% sin que tenga que realizarse un marcado especial de la misma.

Si la sustitución de gasolina en motores de explosión se da en bajas proporciones, 5, 10 y 15% (E5, E10 y E15, respectivamente), no se precisan modificaciones en los motores y demás sistemas. Sin embargo, si la utilización de etanol en motores de explosión se da de forma total o en porcentajes elevados (E85) es necesario realizar modificaciones (Ballesteros, 2006).

### **2.1.2.1. Contexto histórico**

El origen del uso de los biocombustibles para el transporte se remonta a los inicios del transporte motorizado. Fue el inventor norteamericano Samuel Morey el primero que utilizó alrededor de 1820 una mezcla de etanol y trementina en motores de combustión interna. Más tarde, en el mismo siglo XIX, el ingeniero alemán Nicholas Otto desarrolló el primer motor de combustión interna que funcionaba con etanol y el industrial estadounidense Henry Ford fabricó el primer automóvil de cuatro tiempos movido por etanol puro. Años más tarde, también Henry Ford, diseñó el Modelo T apto para funcionar con etanol puro, con gasolina o con una mezcla de los dos (Solomon y col., 2007).

A finales del siglo XIX tuvo lugar la primera demostración de funcionamiento de un motor diésel en la Feria de Exhibición de París, dicho motor utilizaba aceite de

## 2. INTRODUCCIÓN

---

cacahuete como combustible. Su inventor, Rudolph Diesel, pensaba que el futuro de dicho motor pasaba por la utilización de combustibles procedentes de la biomasa, y así fue de hecho hasta los años 20, cuando, a partir de entonces, el desarrollo de la industria petrolera relegó la utilización de los mismos.

En la primera parte del siglo XX, cuando los suministros de petróleo en Europa empezaron a escasear, se comenzó a producir bioetanol combustible a gran escala. Después de la Segunda Guerra Mundial, los precios del petróleo disminuyeron y ello causó un descenso en el uso de biocombustibles. El uso limitado del bioetanol continuó hasta la crisis del petróleo que tuvo lugar en los años 70. En 1973, la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) limitó el suministro de petróleo aumentando los precios. Dicha acción de la OPEP evidenció la gran dependencia de los países del petróleo extranjero, lo que promovió un nuevo cambio hacia el uso de los combustibles alternativos.

Ya en el siglo XXI la producción mundial total de bioetanol se triplicó entre 2000 y 2007 hasta alcanzar más de 25,5 Mtep, siendo dicho bioetanol producido comercialmente a partir de materias azucaradas o amiláceas (Sims y col., 2008).

El cultivo azucarado más ampliamente empleado para la producción de bioetanol es la caña de azúcar, ya sea en forma de melaza o de zumo de caña (Limtong y col., 2007; Sánchez y Cardona, 2008). En cuanto al bioetanol producido de cultivos amiláceos, la mayor parte proviene del maíz (Bothast y Schlicher, 2005; Devantier y col., 2005) y en menores cantidades del trigo (Wang y col., 1999a; Blanco y Saquete., 2008) pero también de la tapioca (Aggarwal y col., 2001), centeno (Wang y col., 1999b) cebada (Blanco y Azqueta, 2008) o sorgo (Laopaiboon y col., 2007; Zhan y col., 2003). El bioetanol producido actualmente a nivel industrial a partir de las mencionadas materias primas forma parte de los denominados combustibles de primera generación.

El principal problema derivado de la producción de bioetanol a partir de este tipo de biomasa es el elevado coste de la materia prima, ya que dichas biomasa azucaradas y amiláceas están ligadas al mercado alimentario, lo que repercute en el precio final del producto. Además del dilema moral que puede suponer la utilización de productos alimentarios con fines energéticos.

Para lograr un precio competitivo del bioetanol se deben reducir los precios de las materias primas, ya que éstas pueden llegar a suponer un 60-70% del coste final del etanol (Wyman, 1999). En ese contexto, aparecen los denominados biocombustibles de segunda generación, producidos a partir de biomasa lignocelulósica, barata y abundante, y cuya producción mundial potencial se ha calculado en 16 veces más alta que la actual producción a partir de almidón o azúcares (Kim y Dale, 2004).

### ***2.2. ETANOL LIGNOCELULÓSICO***

El bioetanol producido a partir de materias lignocelulósicas, también llamado bioetanol de segunda generación, se presenta como alternativa de futuro a los biocombustibles de primera generación. La biomasa lignocelulósica no compite con el mercado alimentario, y, al estar ampliamente distribuida, su coste es menor, lo que contribuye a disminuir el precio final del biocombustible.

La biomasa lignocelulósica puede clasificarse según Sánchez y Cardona (2008) en seis grupos principales: i) residuos agrícolas (p.ej. bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, paja de cebada...), ii) maderas duras (p.ej. álamo, chopo), iii) maderas blandas (p.ej. pino, píceas), iv) residuos celulósicos (p.ej. papel de periódico, lodos de papel reciclado, residuos de papel de oficina), v) biomasa herbácea (p.ej. alfalfa, alpiste, limoncillo); y vi) residuos sólidos urbanos (RSU).

Entre las diferentes materias primas de origen lignocelulósico, la paja de trigo es una abundante fuente de biomasa, principalmente en Europa. En el caso concreto del trigo, cada kilogramo de grano produce 1,1 kg de paja (Bamaga y col., 2003) y, según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAOSTAT, 2007) en el mundo se produjeron 607 millones de toneladas de trigo en el año 2007, lo que supone 670 millones de toneladas de paja de trigo disponibles. Teniendo en cuenta la paja de trigo utilizada para alimentación animal y para el mantenimiento de suelos, alrededor del 60% de la producción de paja de trigo mundial podría asignarse para propósitos energéticos, siendo una de las fuentes de biomasa

lignocelulósica más abundantes (Kim y Dale, 2004). Asimismo, debido a su alto contenido en celulosa, la paja de trigo es una opción muy prometedora como materia prima en los procesos de producción de etanol mediante hidrólisis enzimática y fermentación (Alfani y col., 2000; Olsson y col., 2006).

Además de los residuos agrícolas como la paja de trigo, otros ejemplos de residuos lignocelulósicos abundantes que pueden emplearse para la producción de bioetanol son los generados por la industria maderera y del papel, cuya producción mundial en 2007 fue de 102 y 194 millones de toneladas respectivamente (FAOSTAT, 2007).

### **2.2.1. Composición de la biomasa lignocelulósica**

La biomasa lignocelulósica está formada básicamente por tres componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) junto con otros componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular como son los extractivos y las cenizas. La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos de alto peso molecular que representan entre el 60-80% del total del peso de los materiales lignocelulósicos. La lignina es un polímero no polisacárido tridimensional de unidades fenilpropano y representa entre el 20-35% del total.

Entre los componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular se encuentran, representando entre el 4-10% del peso seco, diferentes grasas, terpenos, alcaloides, proteínas, fenoles, pectinas, gomas, resinas, etc., cuyas proporciones y composición dentro de un mismo tipo de material varían en función de la edad, estado de crecimiento u otros factores. Las cenizas presentes en la biomasa contienen principalmente Ca, K y Mg y son compuestos inorgánicos que persisten después de la incineración del material (Fengel y Wegener, 1989).

Como se puede observar en la tabla 2.1, la proporción de los diferentes componentes principales de la biomasa lignocelulósica varía dependiendo del tipo de material.

**Tabla 2.1. Composición de diferentes materiales lignocelulósicos encontrados en la bibliografía.**

Biomasa	Glucano	Xilano	Manano	Galactano	Arabinano	Lignina	Referencia
Maderas duras							
Chopo	43,5	15,5	2,5	2,3	1,5	26,2	(Negro y col., 2003)
Arce	44,9	17,3	2,9	n.d.	2,8	28,0	(Wyman, 1996)
Nogal	46,2	16,5	2,6	n.d.	1,8	21,9	(Wyman, 1996)
Sauce	41,5	15,0	3,0	2,1	1,8	25,2	(Sassner y col., 2006)
Abedul	38,2	18,5	1,2	n.d.	n.d.	22,8	(Hayn y col., 1993)
Álamo	49,9	17,4	4,7	1,2	1,8	18,1	(Wyman, 1996)
Maderas blandas							
Pino	46,4	7,8	10,6	n.d.	2,2	29,4	(Wyman, 1996)
Abeto	49,9	5,3	12,3	2,3	1,7	28,7	(Soderstrom y col., 2003)
Otras							
Ramón de olivo	25,0	9,8	0,7	1,4	2,1	18,8	(Cara y col., 2007)
Residuos de maíz	36,8	22,2	n.d.	2,9	5,5	23,1	(Öhgren y col., 2005)
Paja de trigo	30,2	18,7	n.d.	0,8	2,8	17,0	(Ballesteros y col., 2006)
Paja de cebada	33,1	20,2	n.d.	0,9	3,8	16,1	(García-Aparicio y col., 2006)

n.d. no detectado

### 2.2.1.1. Celulosa

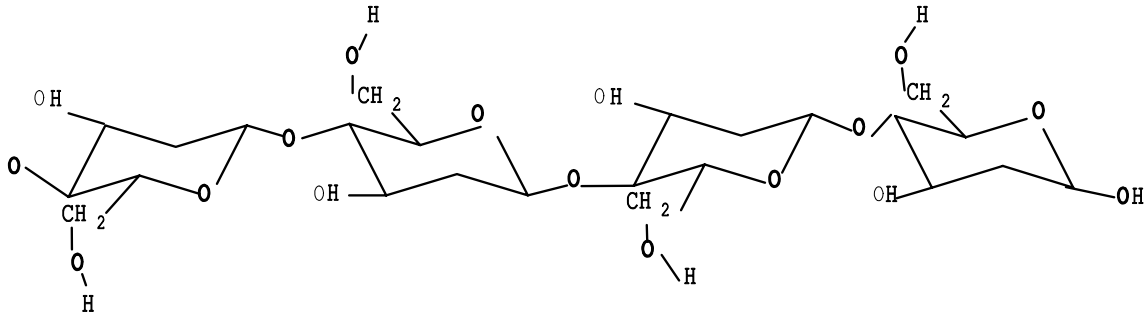
La celulosa es la macromolécula más abundante de la Tierra y su producción anual se ha estimado en  $10^{11}$  toneladas (Brown, 2003). La celulosa es sintetizada por una gran cantidad de organismos vivos y, aunque la mayor parte de la celulosa procesada para la producción industrial proviene de plantas, algunas bacterias, cianobacterias, hongos y algas verdes también son capaces de sintetizarla (Nobles y col., 2001; Zogaj y col., 2001).

La celulosa es un polímero lineal de monómeros de D-glucosa que se unen por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (figura 2.1) y cuyo peso molecular medio es de 100.000 (McKendry, 2002). Se sintetiza en la naturaleza como moléculas individuales de D-glucosa que se van ensamblando en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas que se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas. Las estructuras fibrilares están estabilizadas lateralmente por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo intra e

## 2. INTRODUCCIÓN

---

intermoleculares y todos los átomos de carbono están fijados en una posición concreta respecto a los otros.



**Figura 2.1. Estructura de la cadena de celulosa.**

Las regiones donde las microfibrillas presentan una estructura altamente ordenada se llaman regiones cristalinas y las regiones con una estructura menos ordenadas se denominan amorfas, por ello la celulosa se considera un polímero semicristalino. Las dos formas cristalinas que se encuentran en la celulosa nativa es decir, en las fibras naturales, son la celulosa I y la celulosa II, siendo la más abundante la celulosa I donde las cadenas de glucosa están orientadas paralelamente (Brown, 2003). Por el contrario, en la celulosa nativa II, que es sintetizada principalmente por algas y algunas bacterias, las cadenas de glucosa son antiparalelas (Brown, 2003).

La estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las protofibrillas y microfibrillas son aspectos muy importantes que condicionan la posterior hidrólisis de la celulosa. Las diferencias en el grado de polimerización y peso molecular también influyen en el comportamiento de la celulosa durante la hidrólisis, ya sea mediante el uso de enzimas o productos químicos. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar (Zhang y Lynd, 2004).

### 2.2.1.2. Hemicelulosa

Junto con la celulosa, la hemicelulosa está también presente en la pared celular de las plantas. Consta de polímeros formados por más de un tipo de azúcares tales como la D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, D-xilulosa, etc, y por varios ácidos urónicos, como el ácido glucurónico y galacturónico. Su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina (Sun y col., 1998).

Generalmente está constituida por una cadena principal que puede consistir en una única unidad (homopolímero) p. ej. xilanos, o estar formada por dos o más unidades (heteropolímero) p. ej. glucomananos. De forma general, en función del azúcar dominante en la cadena principal, se pueden agrupar en: xilanos, mananos, glucanos y galactanos (Fengel y Wegener, 1989). Dichas cadenas, a diferencia de la celulosa, pueden presentar ramificaciones y sustituciones mediante enlaces covalentes.

Existen diferencias en la composición y estructura de las hemicelulosas entre los diferentes tipos de biomásas. En las maderas duras el xilano es el polímero más abundante, está altamente sustituido por grupos acetilos y puede representar hasta un 30% del peso total (Dahlman y col., 2003; Fengel y Wegener, 1989). Por el contrario, el polímero más abundante en las hemicelulosas de las maderas blandas es el galactoglucomanano y presenta mayor cantidad de unidades de manosa y galactosa que las maderas duras (Dahlman y col., 2003).

En los residuos agrícolas, el componente hemicelulósico es muy parecido al de las maderas duras pero presentando, al igual que las maderas blandas, menor proporción de grupos acetilo (Fengel y Wegener, 1989).

En el caso concreto de la paja de trigo, al igual que en la mayoría de materiales herbáceos, los xilanos son cuantitativamente dominantes en la fracción hemicelulósica (Sun y col. 1998). Dichos xilanos contienen una cadena principal formada por residuos de D-xilopiranosos unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). El xilano más abundante es el arabinoxilano caracterizado por la unión mediante un enlace O-glucosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) de moléculas de  $\alpha$ -L-arabinofuranosas a la cadena de xilano principal (figura 2.2). Además

de por arabinosas, dichos xilanos pueden estar sustituidos por unidades de galactosa, ácido glucurónico o ácido 4-O-metil-glucurónico (Sun y col., 2000; Sun y Tomkinson, 2003). Es a través de estos intermediarios monoméricos de la hemicelulosa por donde se producen las principales uniones a la lignina.

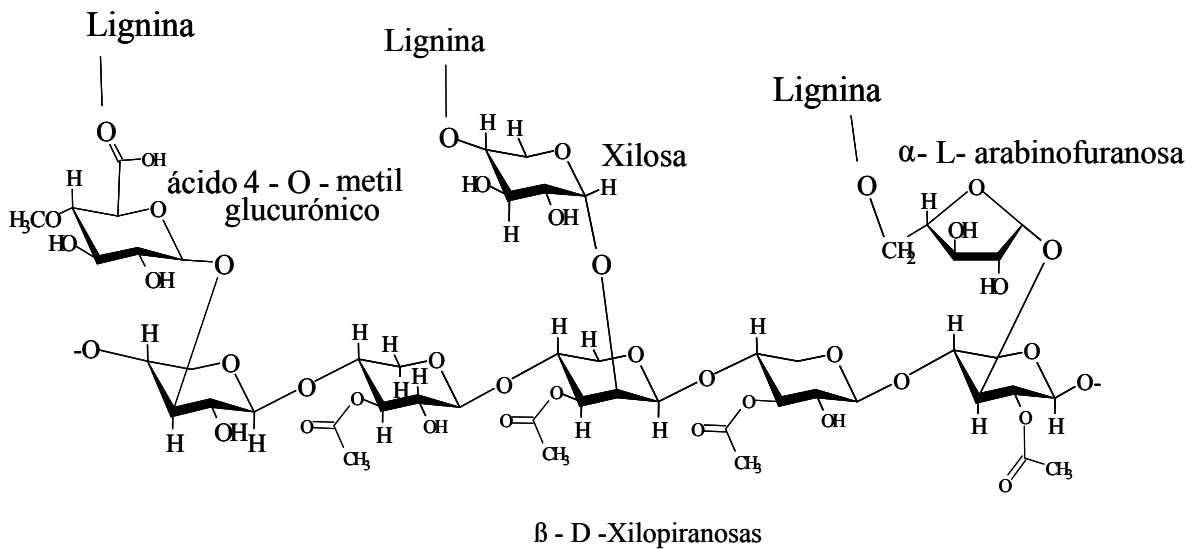


Figura 2.2. Arabinoxilano característico de la hemicelulosa de la paja de trigo.

Las diferencias en la composición de azúcares, la presencia de cadenas más cortas y las ramificaciones de las cadenas principales hacen que la estructura hemicelulósica sea mucho más fácil de hidrolizar que la celulosa (Fengel y Wegener, 1989).

### 2.2.1.3. Lignina

La lignina es el tercer componente mayoritario en los materiales lignocelulósicos, es por ello el tercer polímero natural más abundante en la naturaleza tras la celulosa y hemicelulosa (Buranov y Mazza, 2008). Es un polímero tridimensional amorfo cuyos monómeros básicos, llamados alcoholes cinamílicos, son: el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (figura 2.3) (Higuchi, 1990). Estos tres alcoholes aromáticos dan lugar a unidades *p*-hidroxifenilo (H), unidades guayacilo (G), y unidades siringilo (S) respectivamente, cuya proporción también varía en las maderas

duras, maderas blandas y biomasa herbácea (Evers y col., 1999; Fengel y Wegener, 1989).

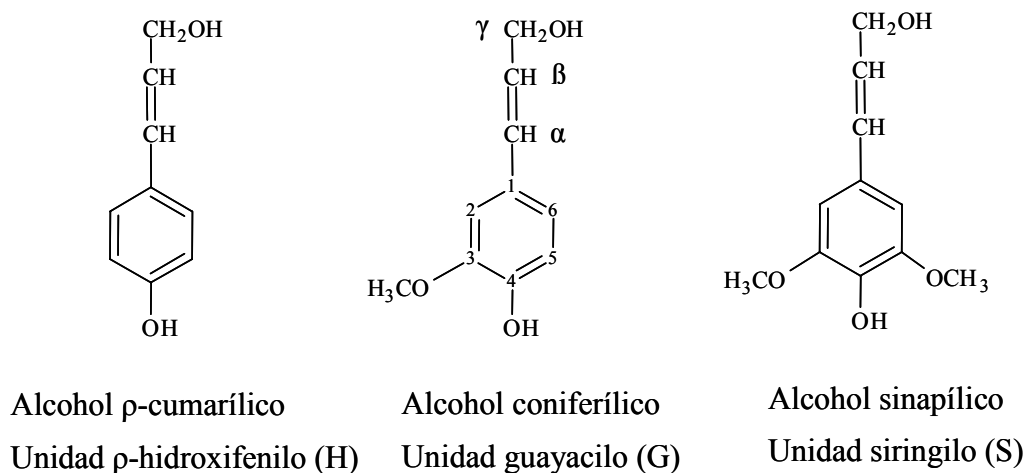


Figura 2.3. Alcoholes cinámilicos precursores de la lignina.

El contenido en lignina, al igual que en el caso de las hemicelulosas, difiere entre los diferentes materiales lignocelulósicos. La estructura química de la lignina de las maderas ha sido ampliamente estudiada, sin embargo en el caso de los materiales herbáceos como la paja, su estructura y las interacciones entre los demás componentes de la pared celular no son todavía bien conocidas. En la figura 2.4 se muestra una aproximación de la estructura de la lignina para la paja de trigo.

La lignina de las maderas blandas está formada principalmente por unidades G, mientras que la lignina de las maderas duras está formada por unidades S y G. A su vez, los materiales herbáceos, son ricos en unidades S, G y H. En el caso concreto de la paja de trigo, la lignina contiene unidades H, G y S en unas proporciones aproximadas de 5, 49 y 46% respectivamente (Buranov y Mazza, 2008).

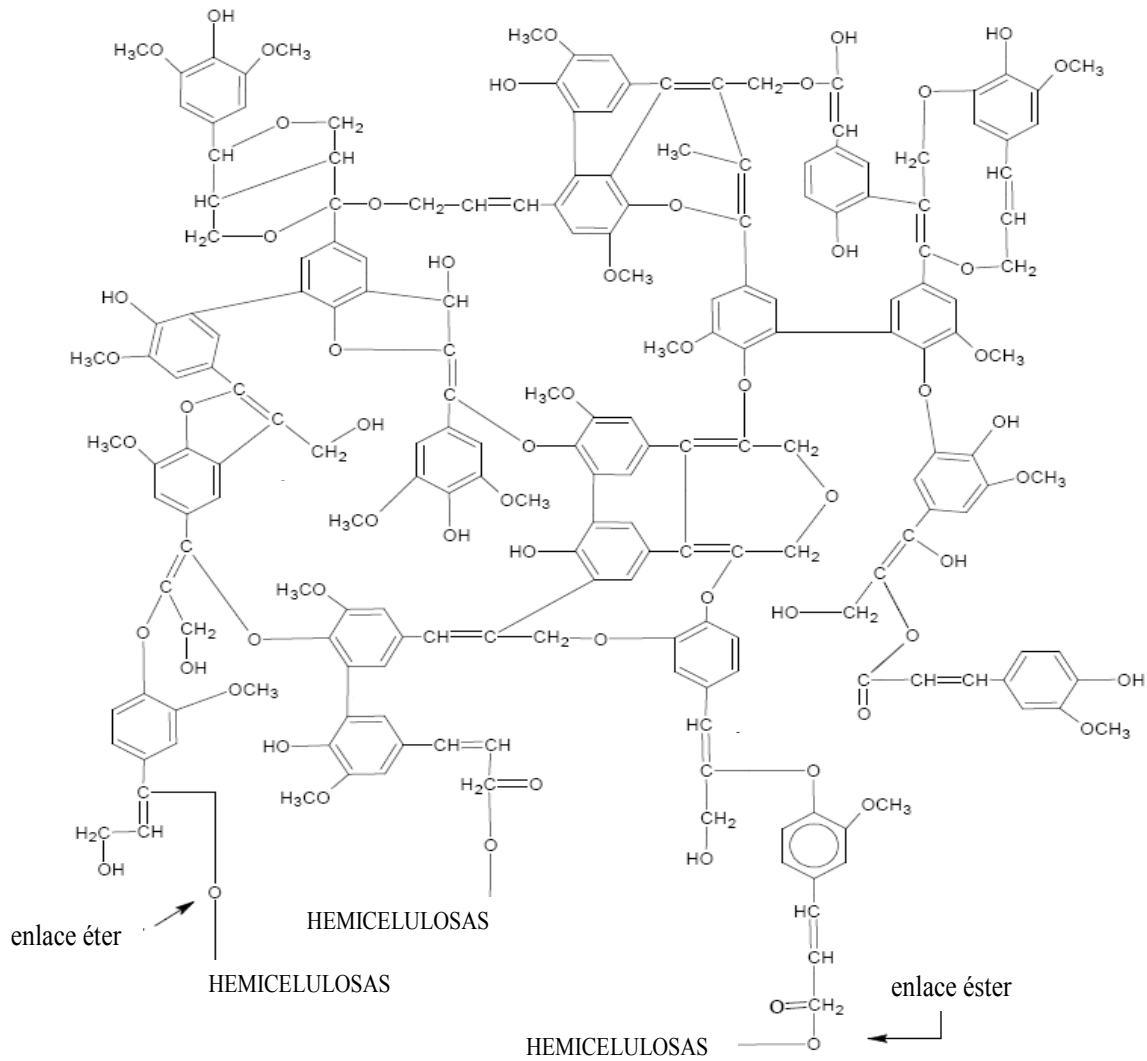


Figura 2.4. Estructura aproximada de la lignina en la paja de trigo.

La lignina confiere rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos además de participar en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Es más recalcitrante a la degradación enzimática que la celulosa y hemicelulosa y está unida a ambas formando una barrera impermeable que dificulta el ataque enzimático (Howard y col., 2003). Las uniones lignina-hemicelulosa se realizan mediante otros intermediarios cinamílicos diferentes a los anteriores, siendo los principales el ácido ferúlico, el ácido diferúlico y el ácido *p*-cumárico (Iiyama y col., 1990; Lam y col., 2001) los cuales se unen mediante diferentes intermediarios monoméricos a la cadena principal del xilano. Esta fuerte asociación entre los

componentes de la lignocelulosa afecta la degradación enzimática, por ello se han estudiado diferentes métodos químicos y físicos de deslignificación como paso previo a la hidrólisis enzimática con el fin de obtener mayores rendimientos de hidrólisis (Berlin y col., 2006; Pan y col., 2004).

### **2.2.2. Proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica**

Para que los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica den lugar a azúcares potencialmente fermentables, se debe someter a la biomasa a una etapa de hidrólisis. La hidrólisis de los polisacáridos puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática). La hidrólisis ácida puede realizarse mediante un ácido concentrado o un ácido diluido. Al utilizar ácidos concentrados, la gran cantidad de ácido empleada, lo costoso de su recuperación y la necesaria neutralización del medio antes de la fermentación unida a los efectos corrosivos de los ácidos hacen que el proceso no sea rentable económicamente. Si se emplean ácidos diluidos se requieren temperaturas relativamente altas que provocan una mayor corrosión de los equipos y mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos. Es por ello que, los procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática (HE) son los que se muestran como opciones más prometedoras.

El proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica basado en la HE consta básicamente de las siguientes etapas: pretratamiento, HE, fermentación y destilación (figura 2.5). Estas etapas pueden llevarse a cabo mediante distintas configuraciones de proceso o diferentes niveles de integración como será discutido más adelante.

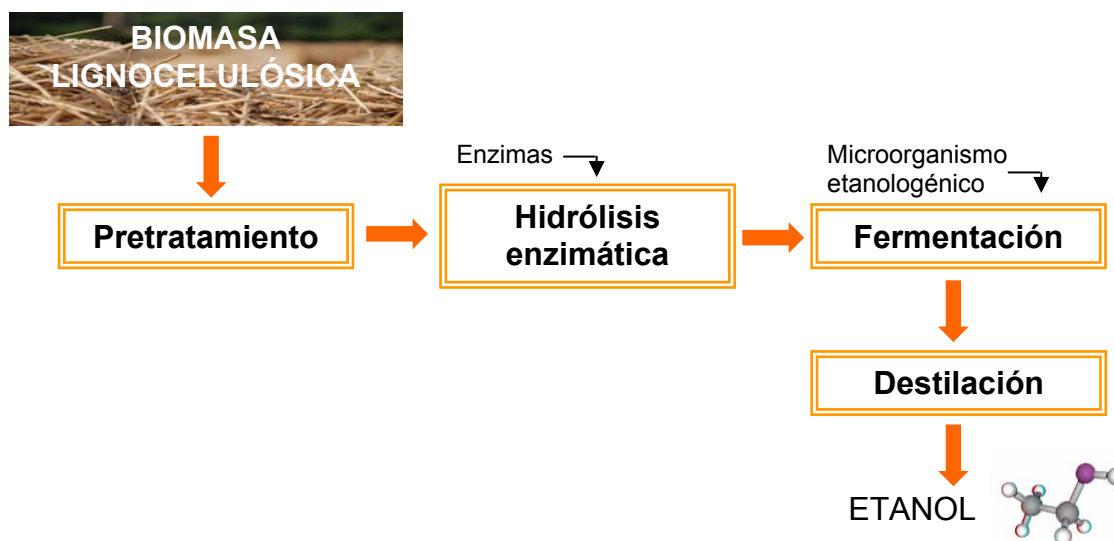


Figura 2.5. Esquema general del proceso de producción de etanol vía enzimática.

### 2.2.2.1. Pretratamiento

Cuando en la etapa de hidrólisis de la celulosa se emplean catalizadores enzimáticos, debido a las características estructurales de los materiales lignocelulósicos anteriormente mencionadas, el pretratamiento es una etapa crucial. La incubación de materiales celulósicos de forma natural en presencia de preparaciones de celulasas resulta generalmente en unos rendimientos de HE inferiores al 20%, debido a que la fuerte asociación de la celulosa con la lignina constituye una verdadera barrera física a la penetración de las enzimas (Lynd y col., 2002).

Un pretratamiento efectivo debe dissociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa con el fin de aumentar la accesibilidad de ésta a las enzimas, debe alterar las características estructurales de la celulosa, tales como la cristalinidad o el grado de polimerización, y provocar la solubilización y/o redistribución de la lignina (Wyman y col., 2005). Desde un punto de vista económico, se ha estimado que el pretratamiento representa aproximadamente el 33% del coste total del proceso (Lynd, 1996) y por ello, es necesario desarrollar tecnologías de pretratamiento eficientes que reduzcan los costes del proceso global de producción de etanol.

Existen diferentes tecnologías de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, que pueden ser clasificadas según su naturaleza en pretratamientos físicos, químicos, biológicos y físico-químicos (Sun y Cheng, 2002).

Dentro de los pretratamientos físicos se engloba la molienda que utiliza fuerzas de impacto y cizalla para disminuir la cristalinidad de la celulosa (Sánchez y Cardona, 2008; Sun y Cheng, 2002). Los requerimientos energéticos en este tipo de pretratamientos dependen del tamaño final de partícula que se quiera alcanzar y de la materia prima a pretratar, pero en todos los casos supone altos costes energéticos y de capital.

Los pretratamientos químicos emplean diferentes agentes como el ozono, ácidos, alcalis, peróxido y solventes orgánicos. Entre los diferentes pretratamientos químicos, el pretratamiento con ácido diluido ha sido el más estudiado y mejora significativamente la hidrólisis enzimática (Saha y col., 2005).

Los pretratamientos biológicos implican el uso de microorganismos como los hongos de la podredumbre blanca, parda o blanda, capaces de degradar la lignina y hemicelulosa (Cardona y Sánchez, 2007; Tengerdy y Szakacs, 2003). El principal inconveniente es que dichos hongos también consumen celulosa, lo que supone un problema para el rendimiento total del proceso (Sun y Cheng, 2002). Además, la lentitud a la que se desarrollan estos procesos supone una desventaja adicional.

Entre los pretratamientos físico-químicos la explosión por vapor (EV) ha sido el pretratamiento más ampliamente utilizado para la biomasa lignocelulósica (Avellar y Glasser, 1998; Ballesteros y col., 2006; Brownell y Saddler, 1984). Debido a su idoneidad para un amplio rango de materias primas, entre las que se encuentra la paja de trigo, es el pretratamiento elegido para pretratar el material lignocelulósico utilizado en la esta Tesis Doctoral y será discutido más en detalle a continuación.

Junto a la EV, el pretratamiento con agua caliente en fase líquida (ACL) y la explosión por vapor con amoníaco (AFEX, del inglés “amonia fiber explosion”) también se muestran como pretratamientos físico-químicos eficientes para la biomasa

lignocelulósica (Negro y col., 2003; Pérez y col., 2007). El ACL consiste en someter a la biomasa a agua caliente en estado líquido y alta presión durante un periodo determinado de tiempo (Pérez y col., 2007; Van Walsum y col., 1996). Con este pretratamiento se obtiene una gran recuperación de los azúcares hemicelulósicos y se generan concentraciones bajas de productos de degradación (Hendriks y Zeeman, 2009).

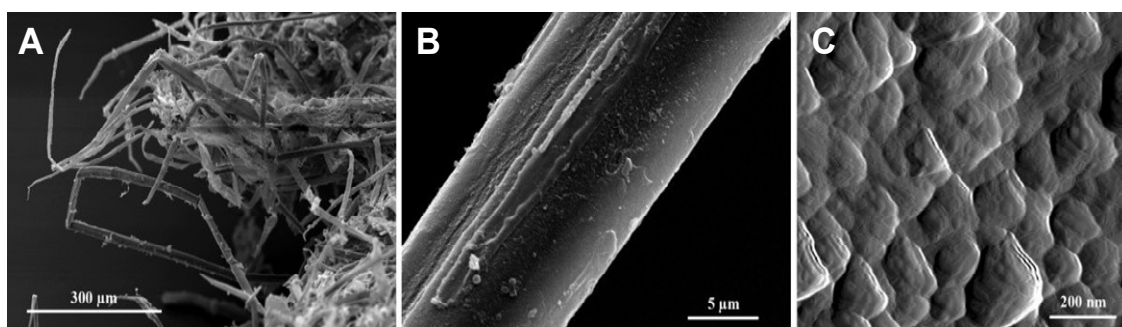
El pretratamiento AFEX es similar a la EV. La biomasa se impregna con amoniaco a alta presión y el pretratamiento se realiza a temperaturas por debajo de 100 °C (Mosier y col., 2005; Teymouri y col., 2005). El material se somete a una rápida descompresión, lo que modifica la estructura de la lignina, favoreciendo la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Este pretratamiento ha sido empleado con éxito con materiales herbáceos, sin embargo, no se obtienen demasiado buenos rendimientos con maderas duras y no es adecuado para las maderas blandas (Himmel y col., 1997).

De entre todos los pretratamientos mencionados, los físicos como la molienda, los químicos como la ozonólisis y los biológicos, no parecen adecuados para su desarrollo a escala comercial debido su elevado coste energético. Sin embargo, la EV, el ACL, el pretratamiento con ácido diluido y el AFEX se consideran pretratamientos con potencial para su implementación a escala comercial (Mosier y col., 2005).

### **2.2.2.1.1. *Pretratamiento de explosión por vapor***

El pretratamiento por explosión por vapor (EV) es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa es sometida a la acción de vapor saturado a relativamente alta presión durante un periodo determinado de tiempo (que puede variar desde unos segundos a varios minutos) tras el cual, el reactor se somete a una brusca descompresión. La EV combina efectos mecánicos con efectos químicos. Los efectos mecánicos están causados por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando fuerzas de cizalladura que producen separación de las fibras, principalmente en las zonas de celulosa amorfa más débiles. El efecto químico se debe a que algunos grupos acetilos de las hemicelulosas son hidrolizados produciendo ácido acético, éste disminuye ligeramente el pH del agua y a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante la EV la lignina es

redistribuida y parcialmente solubilizada (Palonen, 2004). Estudios recientes han concluido que la solubilización parcial de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina son efectos, incluso más importantes que la ruptura de las fibras o modificación de la cristalinidad de la celulosa, para el aumento de la digestibilidad de la paja de trigo durante la hidrólisis (Kristensen y col., 2008). En la figura 2.6 se muestran diferentes imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía de fuerza atómica (MFA) de paja de trigo pretratada por EV.



**Figura 2.6.** Imágenes de MEB y MFA de paja de trigo pretratada por EV. (A) Separación de fibras tras la EV (imagen por MEB). (B) Capa superficial de una fibra individual con depósitos de polímeros de la pared celular (MEB). (C) Depósitos globulares característicos de la lignina (imagen por MFA) (Kristensen y col., 2008).

La EV se ha mostrado como un método de pretratamiento adecuado para aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático para un amplio rango de materias primas como chopo (Oliva y col., 2003), eucalipto (Ramos y col., 1992), ramón de olivo (Cara y col., 2006), bagazo de maíz (Öhgren y col., 2006a), bagazo de caña de azúcar (Glasser y Wright, 1998) y paja de trigo (Ballesteros y col., 2006). Sin embargo, este pretratamiento se muestra menos eficaz con las maderas blandas debido a su mayor contenido en lignina y menor número de grupos acetilo, lo que provoca que el proceso de autohidrólisis no sea tan efectivo. En el caso de las maderas blandas es necesario añadir un catalizador ácido, lo que implica mayor generación de productos tóxicos.

Los factores que afectan en mayor medida la efectividad del pretratamiento de EV son el tamaño de partícula del material a pretratar, la temperatura y el tiempo de residencia. El efecto de la combinación de estos dos últimos puede expresarse con el

factor de severidad ( $R_o$ ), siendo los valores entre 3,0 y 4,5 los óptimos para la recuperación de azúcares en un proceso de EV con paja de trigo (Alfani y col., 2000).

Entre las ventajas del pretratamiento EV, cabe destacar la posibilidad de emplear tamaños relativamente grandes de partícula, evitar la adición de catalizadores ácidos (a excepción de las maderas blandas), la alta recuperación de azúcares, buenos rendimientos en la posterior HE y su viabilidad para ser implementado a escala comercial. No obstante, entre sus limitaciones se encuentran la parcial degradación de los azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos tóxicos que son potencialmente inhibidores de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

### **2.2.2.1.2. *Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento***

Cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el pretratamiento (alta temperatura, alta presión, ambiente ácido...) puede darse cierta degradación de la lignina y de los azúcares, ya sean hemicelulósicos o celulósicos, generándose productos tóxicos que pueden afectar las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación.

La naturaleza y concentración de los compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento dependen de la materia prima, del pretratamiento utilizado, de las condiciones del mismo y de la utilización o no de catalizadores. Estos compuestos son potencialmente inhibidores para las levaduras en la etapa de fermentación. De ahí, el interés de utilizar levaduras con elevada tolerancia a los inhibidores o que hayan sido sometidas a un proceso de adaptación.

Atendiendo a su origen, los compuestos de degradación pueden dividirse en tres grupos (figura 2.7): derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Larsson y col., 2000). Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) que provienen de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente. En anaerobiosis, la mayoría de los microorganismos fermentadores son capaces de reducir los furanos a sus correspondientes alcoholes de menor toxicidad (Mussatto y Roberto, 2004; Oliva y col.,

2003; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Sin embargo, si los furanos están presentes en altas concentraciones ejercen un efecto inhibitorio sobre el microorganismo, ya que interfieren con enzimas glicolíticas y la síntesis de macromoléculas provocando prolongación de la fase lag y una disminución en la productividad del etanol (Almeida y col., 2000; Klinke y col., 2004).

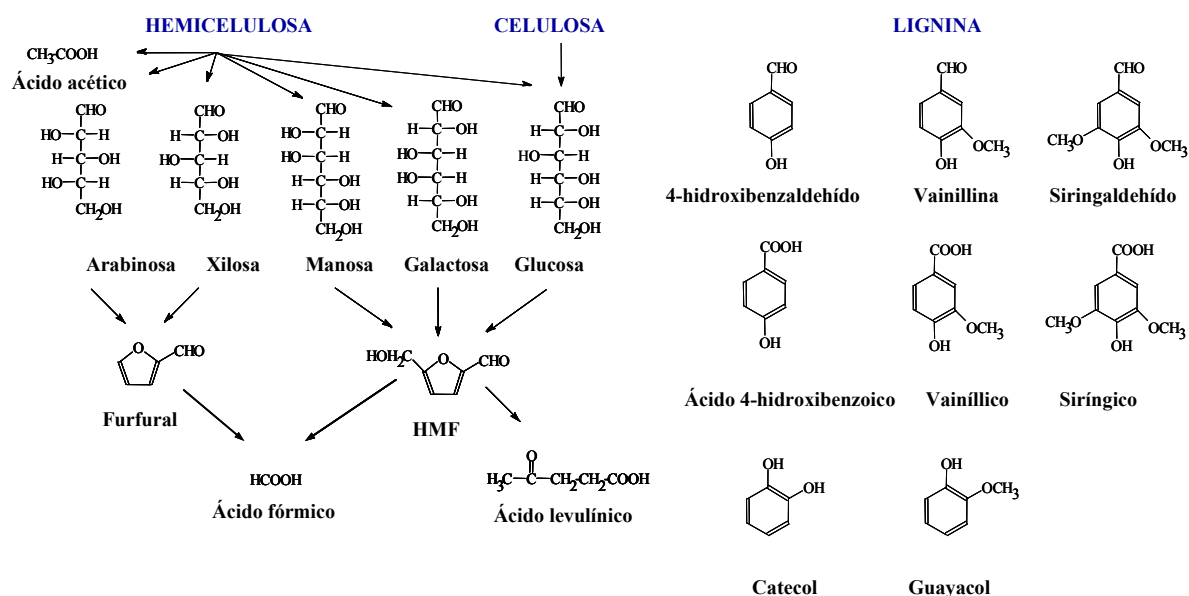


Figura 2.7. Principales productos de degradación originados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Los ácidos alifáticos generados durante el pretratamiento son principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico, procedente de la degradación del furfural e HMF (Almeida y col., 2007; Klinke y col., 2005). El HMF también se descompone en ácido levulínico, encontrándose normalmente en menores concentraciones. Estos compuestos son ácidos débiles cuya forma no disociada puede atravesar la membrana de las células, lo que provoca una disminución del pH intracelular que debe ser compensado por un bombeo de protones al exterior mediante una ATPasa de membrana. Cuando las concentraciones de ácidos en forma no disociada son elevadas, se supera la capacidad de bombeo de protones, lo que provoca acidificación del citoplasma y consiguiente muerte celular (Almeida y col., 2007).

También se generan durante el pretratamiento un amplio rango de compuestos fenólicos como consecuencia de la solubilización de la lignina. Los compuestos fenólicos están presentes en concentraciones más bajas que los anteriores debido a su menor solubilidad, y su concentración aumenta con la severidad del pretratamiento.

Los derivados fenólicos más abundantes en los materiales herbáceos son el 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, acetosiringona, ácido vainílico y ácido siríngico (Klinke y col., 2002). Además de éstos, existen otra serie de compuestos fenólicos que se encuentran en menor cantidad pero que también proceden de la degradación de la lignina de la paja de trigo durante el pretratamiento. Dichos compuestos son, el guayacol, alcohol siríngico, 4-hidroxiacetofenona, acetovainillona, acetosiringona, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cumárico y ácido ferúlico. Incluso a bajas concentraciones afectan negativamente a la fermentación y son más tóxicos cuando menor es su peso molecular. Los compuestos fenólicos causan una pérdida de integridad de la membrana celular y, como consecuencia, se reduce tanto el crecimiento celular como el consumo de azúcares (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

### **2.2.2.2. Hidrólisis enzimática**

Como se ha comentado anteriormente, la primera etapa en el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento. El material insoluble obtenido tras el pretratamiento de EV está formado principalmente por celulosa y lignina, ya que gran parte los azúcares hemicelulósicos son solubilizados durante el mismo. Con el fin de romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa, se emplean diversas enzimas que se conocen con el nombre de celulasas.

La hidrólisis enzimática (HE) constituye una de las etapas limitantes del proceso global de producción de etanol. Las principales dificultades al realizar la HE de la biomasa lignocelulósica están relacionadas con la baja actividad específica de las enzimas actualmente disponibles, lo que conlleva el empleo de altas dosis de celulasas, y con la propia naturaleza de la lignocelulosa. Es por este último inconveniente que el pretratamiento es una etapa crucial en los procesos de producción de etanol mediante HE. Además, el coste de producción enzimática representa una parte significativa del

coste total del proceso. En un proceso de producción de etanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), la producción enzimática puede llegar a constituir el 50% del coste total (Galbe y Zacchi, 2002). Es por ello, que en la última década se han realizado numerosos esfuerzos de I+D para disminuir el coste de los mismos. Por iniciativa del Departamento de Energía de los Estados Unidos; Genencor Internacional y Novozymes Inc., los dos principales productores mundiales de enzimas, están colaborando con el objetivo de lograr una reducción significativa (10 veces) del coste actual del catalizador (DOE, 2006).

Un amplio rango de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias y hongos, son productores de celulasas, pero sólo un pequeño número de éstos son capaces de producirlas en grandes cantidades. Algunas de las bacterias celulolíticas más estudiadas pertenecen al grupo *Cellulomonas*, *Thermobifida*, y *Clostridium* (Lynd y col., 2002). A pesar de que los sistemas enzimáticos producidos por dichas bacterias presentan propiedades interesantes, como la producción de enzimas termoestables y la síntesis de complejos enzimáticos extracelulares o celulosomas, son las celulasas producidas por hongos las que se comercializan actualmente. En concreto, la investigación se ha centrado en algunos géneros de hongos como *Phanerochaete*, *Fusarium* y *Trichoderma* y algunas especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Shizophyllum*, ya que producen celulasas en grandes cantidades y de forma extracelular lo que facilita su recuperación del medio de cultivo.

Las celulasas pertenecen principalmente a tres grupos de enzimas conocidas como endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y  $\beta$ -glucosidasas (BG). El mecanismo de actuación de las celulasas más aceptado actualmente implica una acción sinérgica secuencial entre las EGs y CBHs sobre la celulosa (Medve y col., 1998). Las EGs actúan hidrolizando aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) centrales de la cadena de celulosa creando extremos libres. Las CBHs, también llamadas exoglucanasas, actúan sobre los extremos de las cadenas liberando monómeros de glucosa, celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. Las BGs, son las encargadas de hidrolizar las moléculas de celobiosa en dos moléculas de glucosa. También se produce otro sinergismo entre las EGs y CBHs y las BGs, ya que esta última degrada la celobiosa que tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre las primeras (Yue y col., 2004) (figura 2.8).

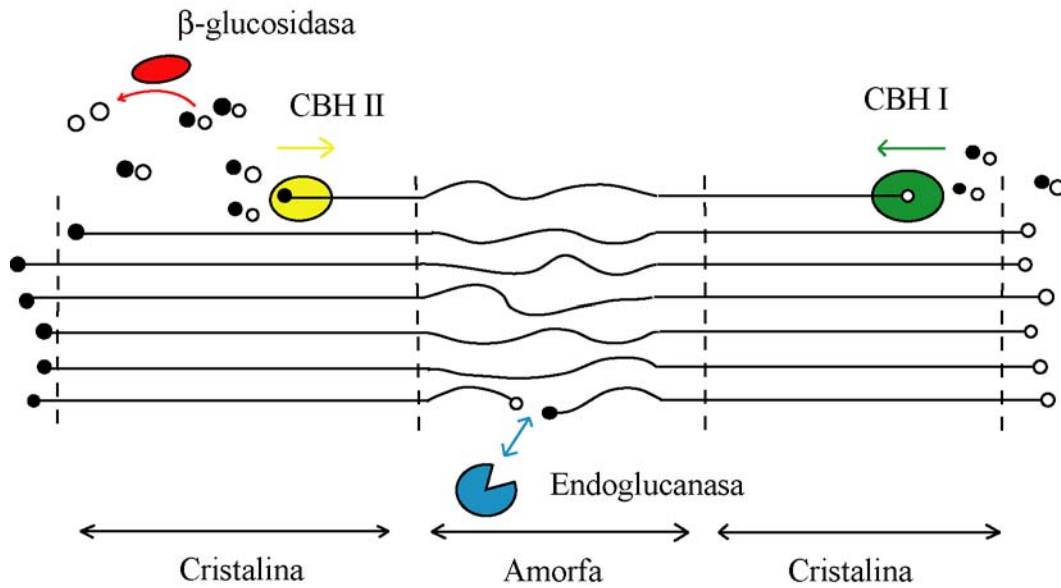


Figura 2.8. Esquema del mecanismo sinérgico del sistema celulolítico.

Los cócteles enzimáticos de celulasas comúnmente comercializados son los producidos por el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* (Gray y col., 2006; Howard y col., 2003). *T. reesei* produce dos tipos de CBHs (CBH I y CBH II), al menos cinco tipos de EGs (EG I, II, III, IV y V) y dos BGs (BG I y BG II) (Saloheimo y col., 2002). Secreta principalmente EGs y CBHs, pero es deficiente en BGs. De ahí que, al emplear preparados comerciales de celulasas obtenidos a partir de este hongo, sea necesario suplementar el cóctel enzimático con BGs con el fin de evitar la acumulación de celobiosa.

La mayoría de los microorganismos productores de celulasas producen también, aunque en menor medida, hemicelulasas. No obstante, existen microorganismos que las producen en cantidades mayores, tales como: *Escherichia coli*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis* y *Thermoanaerobacter mathranii*. Debido a la naturaleza diversa de la hemicelulosa, las hemicelulasas incluyen un mayor número de grupos de enzimas con actividades enzimáticas específicas para cada tipo de enlace. Incluyen enzimas que rompen la cadena principal, como las xilanasas y las β-xilosidasas, y enzimas que rompen las ramificaciones como las α-L-arabinofuranosidasas, α-D-glucuronosidasas, acetixilano esterasas, ferúlico esterasas y β-galactosidasas (Saha, 2003).

La HE de la hemicelulosa es complicada, no sólo por la compleja estructura de la hemicelulosa, sino también debido a las propiedades de las enzimas hemicelulósicas que requieren una acción coordinada de diversas enzimas para su correcta actuación. Además de hidrolizar la hemicelulosa, las hemicelulasas favorecen la hidrólisis de la celulosa aumentando la accesibilidad del sistema celulolítico a las fibras de celulosa (Berlin y col., 2005).

En el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa, como será discutido en apartados posteriores de esta Tesis Doctoral, la HE puede realizarse antes de la fermentación (hidrólisis y fermentación separadas, HFS) o simultáneamente a ésta, (SFS).

### **2.2.2.3. Fermentación**

La fermentación alcohólica es un proceso ampliamente utilizado por el hombre desde hace miles de años para la producción de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza. Cuando la fermentación se emplea en el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática son fermentados con la consiguiente producción de etanol y CO<sub>2</sub>. La conversión estequiométrica de la glucosa y xilosa a etanol es de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar. En la práctica es muy difícil obtener conversiones tan altas ya que las levaduras derivan cierta parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento.

El microorganismo comúnmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que puede usar todo tipo de hexosas y produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0,51 g/g). Además, si se emplea en procesos de producción de etanol a partir de lignocelulosa, muestra gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento. No obstante, *S. cerevisiae* presenta una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación de los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, que también están presentes en los materiales

lignocelulósicos. De ahí el interés de utilizar en este proceso microorganismos capaces de fermentar de forma eficiente todo tipo de azúcares.

La fermentación de las pentosas, la obtención de altos rendimientos a etanol y altas productividades no son las únicas características a tener en cuenta en la elección del microorganismo para un proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa. El microorganismo empleado debe ser también capaz de tolerar los posibles tóxicos generados durante el pretratamiento. En este contexto cobran interés los procesos de adaptación como la ingeniería evolutiva que será comentada más adelante.

### **2.2.2.3.1. Fermentación de la xilosa**

Los residuos agrícolas, entre los que se encuentra la paja de trigo, contienen alrededor de un 25% de azúcares hemicelulósicos, principalmente xilosa. Es por ello que la utilización de la xilosa es esencial para una eficiente y rentable conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol.

Mientras la fermentación de la glucosa puede llevarse a cabo de forma eficiente por numerosos tipos de microorganismos, la fermentación de la xilosa presenta algunas limitaciones. Únicamente bacterias entéricas y algunas levaduras como *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *P. stipitis* son capaces de fermentar la xilosa a etanol, pero con rendimientos relativamente bajos. Además, las levaduras fermentadoras de xilosa no toleran altas concentraciones de etanol, requieren condiciones microaerófilas para su crecimiento y son muy sensibles a los inhibidores y a los cambios de pH (Hahn-Hägerdal y col., 1994).

Actualmente no existen microorganismos que presenten todas las características deseables para la fermentación eficiente de los azúcares procedentes de los materiales lignocelulósicos (fermentación de hexosas y pentosas, altos rendimientos, alta productividad, tolerancia al etanol y a los inhibidores). Puesto que la utilización de forma eficiente de todos los azúcares hemicelulósicos es clave para reducir el coste de la producción de etanol, se están obteniendo microorganismos fermentadores de xilosa mediante técnicas de ingeniería genética; ya sea por la introducción de los genes

relacionados con la producción de etanol en las bacterias entéricas como *E. coli*, o por la introducción de los genes de la ruta de la fermentación de las pentosas en microorganismos productores de etanol como la levadura *S. cerevisiae* o la bacteria etanológica *Z. mobilis*.

Las bacterias que se han mostrado más prometedoras para su utilización a escala industrial son *E. coli*, *Z. mobilis* y *Klebsiella oxytoca*. *E. coli* puede crecer sobre numerosas fuentes de carbono y presenta una elevada tolerancia al etanol. No obstante, las cepas salvajes muestran rendimientos bajos de etanol y convierten los azúcares de forma más eficiente a ácido acético o láctico. Se han llevado a cabo diversas estrategias de ingeniería genética con la finalidad de dirigir los flujos metabólicos de *E. coli* hacia la producción de etanol. Entre las diferentes estrategias destaca la transformación de *E. coli* con un plásmido que contiene los genes que codifican para la PDC (piruvato descarboxilasa) y ADH (alcohol deshidrogenada) presentes en la bacteria etanológica *Z. mobilis* (Doran-Peterson y col., 2008; Ingram y col., 1998; Wang y col., 2008). La cepa *E. coli* KO11 ha sido obtenida mediante esta estrategia y ha sido probada con éxito a escala de laboratorio a partir de diferentes materiales lignocelulósicos (Kim y col., 2008; Mishima y col., 2008; Okuda y col., 2007).

También pueden fermentar la xilosa cepas recombinantes de *Z. mobilis* que han sido genéticamente modificadas mediante la introducción de los genes del metabolismo de la xilosa de *E. coli* (Patle y Lal, 2008). *K. oxytoca* también ha sido transformada con el fin de desviar los flujos del carbono hacia la producción de etanol (Golias y col., 2002). Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos que se han realizado en los últimos años para el desarrollo de estos microorganismos, las alternativas bacterianas para la producción de etanol no están todavía comercializadas.

Debido a la larga tradición en el empleo de *S. cerevisiae* para la producción de etanol a escala industrial existe una preferencia en el empleo de este microorganismo en las aplicaciones comerciales. Sin embargo, puesto que *S. cerevisiae* no presenta la capacidad de fermentar las pentosas a etanol, se están realizando numerosos esfuerzos para modificarla de forma eficaz. *S. cerevisiae* no puede fermentar la xilosa a etanol de forma natural, pero sí fermenta la xilulosa. Por ello las principales estrategias para conseguir cepas de *S. cerevisiae* recombinantes capaces de cofermentar la glucosa y la

## 2. INTRODUCCIÓN

xilosa se han basado en dos diferentes aproximaciones para conseguir la isomerización de la xilosa a xilulosa (Figura 2.9). La primera consiste en la introducción de los genes *XYL1* y *XYL2* de las levaduras fermentadoras de xilosa, que codifican para la xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH) respectivamente. La segunda, en la introducción del gen que codifica para la xilosa isomerasa (XI) presente en bacterias y algunos hongos (Eliasson y col., 2000; Zaldívar y col., 2002). Para un metabolismo eficaz de la xilosa la introducción de *XYL1* y *XYL2* o del gen de la XI debe ir acompañada de la sobreexpresión del gen *XKS1* que codifica para la xiluloquinasa (XK) endógena (Eliasson y col., 2000; Karhumaa y col., 2007).

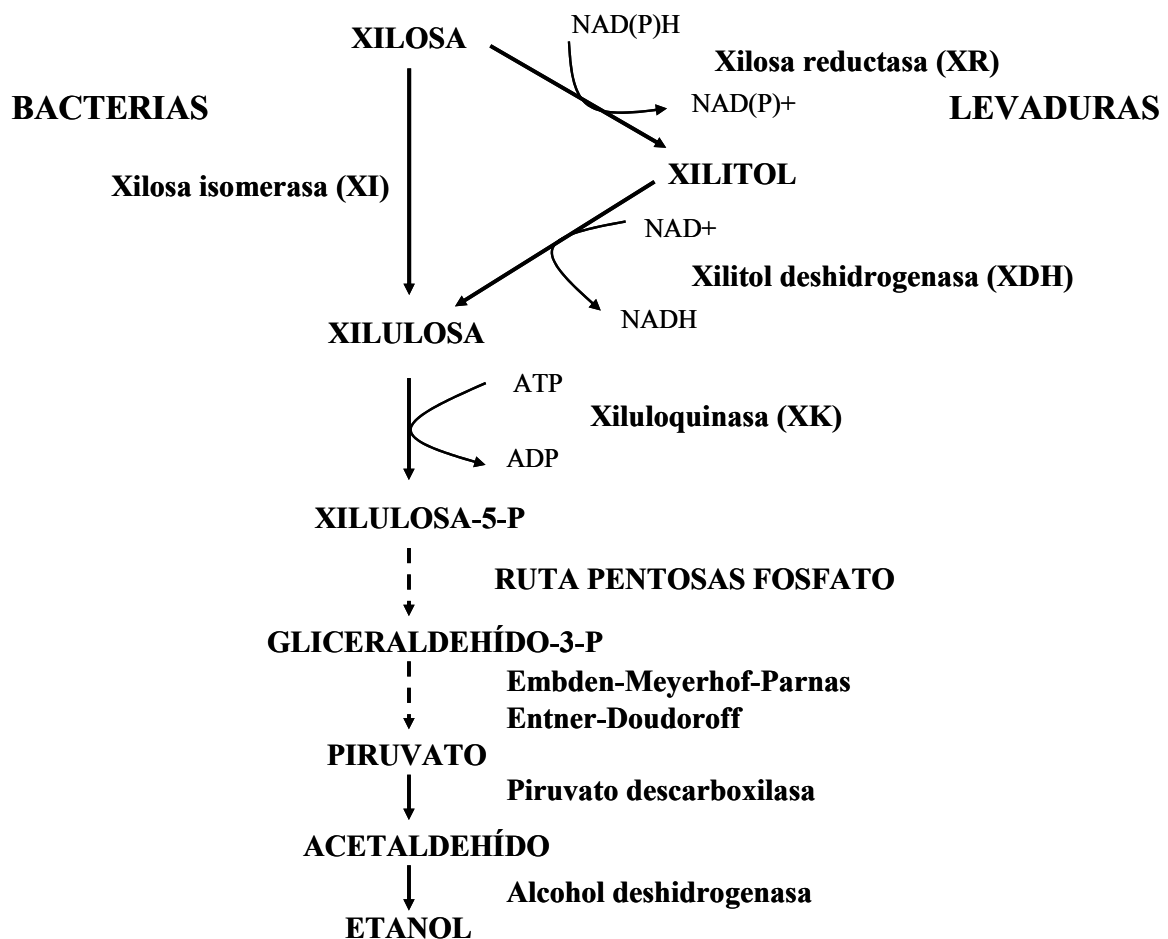


Figura 2.9. Diferentes rutas de la fermentación de la xilosa en bacterias o levaduras fermentadoras de xilosa.

En la tabla 2.2 se muestran algunas cepas de *S. cerevisiae* que han sido modificadas genéticamente y empleadas en procesos de producción de etanol con diferentes materiales lignocelulósicos.

**Tabla 2.2. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en procesos de producción de etanol con diferentes materias primas lignocelulósicas.**

Cepa	Ruta de la xilosa	Material	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> TMB3001	XR-XDH-XK	Bagazo de caña de azúcar.	(Jeppsson y col., 2002; Martin y col., 2002)
<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	XR-XDH-XK	Bagazo de maiz, paja de trigo, paja de cebada, prehidrolizados de madera de abeto.	(Karhumaa y col., 2007; Eliasson y col., 2000; Öhgren y col., 2006b; Olofsson y col., 2008a)
<i>S. cerevisiae</i> TMB3066	XI-XK	Prehidrolizados de madera de abeto.	(Karhumaa y col., 2007)
<i>S. cerevisiae</i> F12	XR-XDH-XK	Pared celular del endospermo del trigo, paja de trigo.	(Olsson y col., 2006)
<i>S. cerevisiae</i> H158	XR-XDH-XK	Prehidrolizados de madera de abedul.	(Johansson y col., 2001)
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK	XR-XDH-XK	Prehidrolizados de madera de abedul.	(Johansson y col., 2001)

Otra dificultad a la que se enfrenta el uso de cepas de *S. cerevisiae* modificadas para la fermentación de pentosas radica en el transporte de los azúcares al interior de la célula, ya que la xilosa y la glucosa comparten transportadores de membrana (Chu y Lee, 2007; Meinander y Hahn-Hägerdal, 1997). *S. cerevisiae* no presenta transportadores específicos para la xilosa y ésta es incorporada mediante transportadores de hexosas con alta y baja afinidad codificados por los 18 genes de la familia *HXT* (Chu y Lee, 2007; Hamacher y col., 2002). Comparado con el transporte de la glucosa a través de dichos transportadores, el transporte de la xilosa es significativamente menos eficiente (Hamacher y col., 2002). Se han desarrollado varias estrategias como la sobreexpresión de diferentes genes que codifican para los transportadores de membrana en *S. cerevisiae* con el propósito de mejorar el consumo de xilosa (Chu y Lee, 2007). También se han expresado con éxito en *S. cerevisiae* diferentes transportadores con mayor afinidad para la xilosa como Sut1 de *P. stipitis* (Katahira y col., 2008), Trxlt1 de *T. reesei* (Saloheimo y col., 2007) y Gxf1 de *Candida intermedia* (Runquist y col.,

2009). Éste último muestra una afinidad por la xilosa aproximadamente tres veces superior a la que presentan los transportadores de *S. cerevisiae* para las hexosas. La mejora en la eficiencia de incorporación de la xilosa dentro de la célula es un gran reto para la optimización de su metabolismo.

Junto con la introducción de los genes necesarios para la conversión de la xilosa a xilulosa y las modificaciones de los genes que intervienen en la síntesis de los transportadores de membrana, las estrategias de ingeniería genética más importantes llevadas a cabo para una eficiente fermentación de la xilosa por *S. cerevisiae* van dirigidas a sobreexpresar la XK nativa, modificar el balance redox y mejorar la ruta de las pentosas fosfato (Matsushika y col., 2009).

Además de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* está siendo estudiada intensamente en los últimos años. Esta levadura crece rápidamente bajo condiciones aeróbicas y puede fermentar la xilosa y glucosa en condiciones limitantes de oxígeno por lo que para una fermentación eficiente es necesario un estricto control de la aireación. El control de la aireación es complejo a gran escala, por ello es preferible el uso de microorganismos capaces de crecer y fermentar xilosa en condiciones anaeróbicas. Con esa finalidad, la expresión del gen *URAI* de *S. cerevisiae* ha sido introducido en *P. stipitis* para favorecer su crecimiento en ausencia de oxígeno (Shi y Jeffries, 1998).

### **2.3. INTEGRACIÓN DE LAS ETAPAS DE PROCESO**

Para que el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa sea eficiente se requiere una completa hidrólisis de los azúcares, tanto celulósicos como hemicelulósicos, y una eficiente fermentación de los azúcares a etanol. Además, el proceso debe realizarse con una baja demanda energética. Para lograr estos objetivos son necesarias altas concentraciones de sólidos iniciales en el medio de fermentación que permitan obtener altas concentraciones finales de etanol, junto con una eficiente integración de las etapas de proceso que permita alcanzar altos rendimientos y baja inversión en equipos.

Como se mencionó anteriormente, el primer paso en el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa es el pretratamiento. Tras esta etapa, normalmente se realiza la filtración del material pretratado con la consiguiente obtención de dos fracciones; una fracción sólida denominada residuo sólido insoluble (RSI), rica en celulosa y lignina, y una fracción líquida o prehidrolizado rica en azúcares hemicelulósicos (principalmente xilosa) y productos inhibidores (ácido acético, furfural, HMF...). Normalmente, con objeto de eliminar los compuestos tóxicos que han quedado adheridos, el RSI se somete a un proceso de lavado antes de ser empleado como sustrato en las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación. Esto implica inevitablemente una pérdida de los azúcares solubles embebidos en dicha fracción y un aumento de la cantidad de agua necesaria en el proceso y de los efluentes producidos. Además también debe considerarse el incremento de coste que supone añadir una etapa adicional de lavado al proceso.

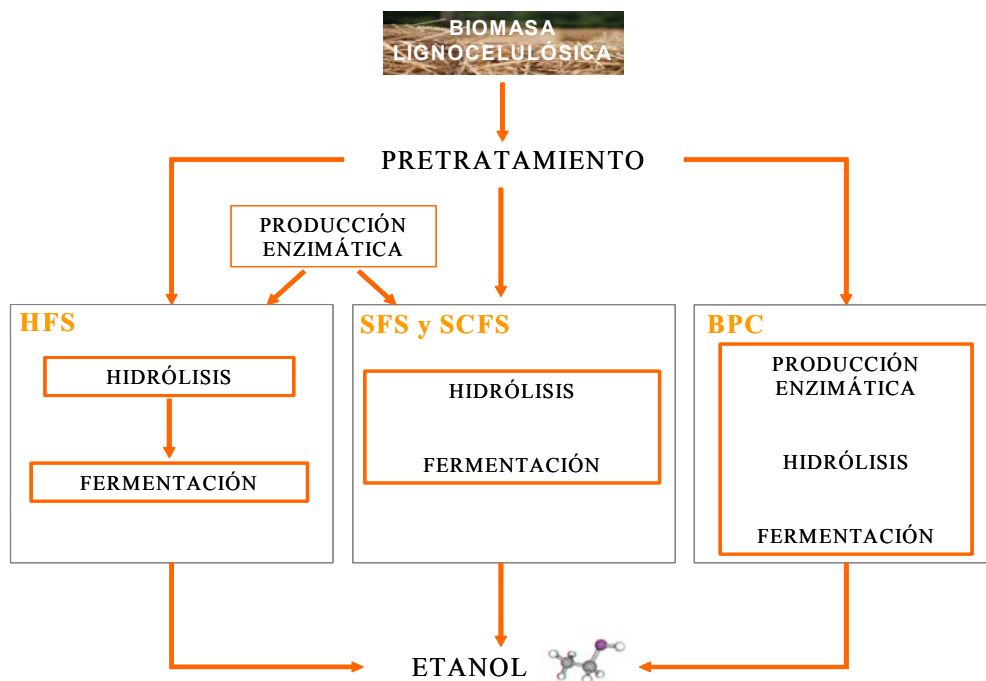
Con el fin de no tener pérdidas de azúcares potencialmente fermentables, minimizar los volúmenes de agua empleados y reducir los costes de proceso, sería conveniente emplear en las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación, el material pretratado completo (MPC) y no únicamente la fracción de RSI (Palmqvist y col., 1997). Al no separar la fracción líquida, además de los azúcares hemicelulósicos solubilizados, también están presentes en el medio los productos de degradación generados durante el pretratamiento. Por ello, es importante utilizar microorganismos con elevada tolerancia a los tóxicos y capaces de fermentar la xilosa de forma eficiente.

El empleo del MPC en lugar del RSI implica, además de mayores concentraciones de tóxicos, viscosidades más altas. Esto supone dificultades en la agitación del medio, una distribución no uniforme de los microorganismos y enzimas, así como una dificultad añadida en el control del pH y la temperatura. Para disminuir estos problemas pueden llevarse a cabo procesos semicontinuos en los que se añade el sustrato por pulsos (del inglés, *fed-batch*) y que serán comentados con posterioridad en el presente capítulo. Los procesos semicontinuos con el MPC, además de favorecer el manejo y homogenización del medio, contribuyen a disminuir el efecto inhibitorio de los productos tóxicos. Las levaduras son capaces de metabolizar los furanos y al ser añadidos al medio de forma continuada se mantienen en concentraciones bajas

## 2. INTRODUCCIÓN

favoreciendo la capacidad de las levaduras para metabolizarlos (Rudolf y col., 2005; Taherzadeh y col., 2000a).

El éxito del desarrollo comercial del etanol celulósico requiere además una simplificación del proceso que se puede alcanzar con una mayor integración de todas las etapas (p ej. integración de la hidrólisis y fermentación en un proceso simultáneo y la cofermentación de pentosas y hexosas). La integración de las etapas de proceso significa una visión global del pretratamiento, HE y fermentación, ya que cada uno de estos pasos tiene una importante repercusión en el siguiente. Esta integración tendrá beneficios en términos de mayores rendimientos, velocidades de producción y concentraciones de etanol más altas lo que se traducirá en menor capital y coste de operación. La figura 2.10 muestra un esquema de los distintos niveles de integración en las diferentes configuraciones de proceso.



**Figura 2.10.** Principales configuraciones de procesos en la producción de bioetanol mediante catalizadores enzimáticos a partir de biomasa lignocelulósica.

### **2.3.1. Hidrólisis y fermentación separadas**

La configuración comúnmente empleada en el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica implica un proceso secuencial en el que la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa se realizan en dos reactores diferentes. En este proceso, denominado hidrólisis y fermentación separadas (HFS), la fracción rica en celulosa es primeramente hidrolizada a glucosa. Una vez completada la hidrólisis y separado el residuo de lignina, la glucosa resultante es fermentada y convertida a etanol. La utilización de un medio líquido rico en glucosa hace posible la recirculación de los microorganismos tras la fermentación.

La principal ventaja en este tipo de procesos es que cada etapa puede ser llevada a cabo en sus condiciones óptimas de pH y temperatura. Esto permite realizar la hidrólisis a temperaturas alrededor de 50 °C, donde se encuentra el óptimo de actividad celulolítica en la mayoría de celulasas y  $\beta$ -glucosidasas fúngicas, y a un pH óptimo entre 4-5. Posteriormente se realiza la fermentación a temperaturas entre 30-37 °C, donde se encuentra el óptimo para la mayoría de microorganismos etanologénicos (Jørgensen y col., 2007).

La principal desventaja en la HFS se debe a que la acumulación de la glucosa y celobiosa en la etapa de hidrólisis inhibe a las celulasas implicadas en el proceso, obteniéndose, por lo tanto, bajos rendimientos de sacarificación (Stenberg y col., 2008; Xiao y col., 2004).

### **2.3.2. Sacarificación y fermentación simultáneas**

Uno de los avances más importantes relacionados con el proceso global de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica ha sido la implementación y desarrollo del proceso conocido como sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), en el que la hidrólisis y la fermentación tienen lugar simultáneamente en un mismo reactor.

En el proceso de SFS la glucosa liberada por acción de las celulasas durante la hidrólisis es directamente metabolizada a etanol por las levaduras. Esta continua eliminación de la glucosa del medio minimiza la inhibición por producto final sobre la actividad de las celulasas (Ballesteros y col., 2004; Olsson y col., 2006) lo que se refleja en rendimientos de hidrólisis más altos, necesidad de menores dosis de enzima, reducción del tiempo total de proceso y productividades de etanol más altas (Alfani y col., 2000; Ballesteros y col., 2002a).

El proceso de SFS se presenta como un método viable y eficiente para la producción de etanol celulósico ya que puede ser empleado con gran variedad de materias primas y con diferentes tecnologías de pretratamiento. No obstante también muestra algunos inconvenientes, ya que las condiciones óptimas de pH y temperatura en las etapas de hidrólisis y fermentación son diferentes y se deben fijar unas condiciones de compromiso entre ambas.

El pH óptimo para la hidrólisis enzimática se encuentra alrededor de 4,8. En cambio, el pH para la fermentación, dependiendo del microorganismo, suele ser 5 o superior. En cuanto a la temperatura óptima, la de la hidrólisis se encuentra alrededor de 50 °C mientras que la mayoría de microorganismos fermentadores tiene su óptimo de temperatura entre los 30-37 °C (Alfani y col., 2000; Jørgensen y col., 2007). En este contexto, el empleo de levaduras termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus* capaces de crecer y fermentar a temperaturas superiores a 40 °C, más cercanas a la temperatura óptima de la hidrólisis, aparece como una alternativa muy prometedora.

*K. marxianus* muestra un elevado potencial para ser empleada en numerosas aplicaciones biotecnológicas (Fonseca y col., 2008). Para la producción de etanol ha sido ampliamente utilizado en procesos de SFS a partir de diferentes materiales lignocelulósicos como madera de chopo (Ballesteros y col., 1998), madera de abeto (Bollók y col., 2000), algunas plantas herbáceas (Suryawati y col., 2008) y residuos de la industria olivarera y del papel (Ballesteros y col., 2001; Kádár y col., 2004). Además, el uso de levaduras termotolerantes lleva asociadas otras ventajas ya que al realizarse la SFS a temperaturas más altas, además de conseguirse mayores rendimientos de HE, se disminuye el riesgo de contaminación por otros microorganismos (Banat y col., 1998; Limtong y col., 2007).

Independientemente de la temperatura a la que se realiza la SFS, la concentración de sólidos en el proceso debe ser tan elevada como sea posible para asegurar altas concentraciones de azúcares que permitan obtener elevadas concentraciones finales de etanol en el medio. Cuanto mayor es la concentración de sustrato durante la SFS, mayor concentración de etanol potencial puede obtenerse, y por lo tanto es necesaria menos energía en los posteriores pasos de destilación y evaporación (Sun y Cheng, 2002; Wingren y col., 2003). Algunos estudios han concluido que un proceso de SFS al 8% (p/v) de RSI resultaba en una disminución de costes del 19% cuando se comparaba con una SFS al 5% (p/v) (Wingren y col., 2003). No obstante, en un proceso convencional de SFS el contenido en RSI suele estar limitado al 10% (p/v) debido a la alta viscosidad que presentan la mayoría de materiales lignocelulósicos que dificulta el manejo de los medios en el reactor (Rosgaard y col., 2007; Varga y col., 2004).

La viscosidad de los materiales lignocelulósicos disminuye como resultado de la actividad celulolítica debido a la pérdida de la estructura de la lignocelulosa y su capacidad de retención de agua (Rosgaard y col., 2007). Por ello, una etapa de prehidrólisis o presacarificación previa a la SFS, en la que las enzimas actúan hidrolizando el sustrato antes de la inoculación de las levaduras, hace el medio más fluido, más fácil de manejar y permite alcanzar cargas de sustrato más elevadas. Mediante esta presacarificación también se produce una mejor agitación del medio, una distribución uniforme de los microorganismos y enzimas, así como un mejor control del pH y la temperatura. La prehidrólisis muestra otras ventajas ya que al poder realizarse a temperaturas más altas, debido a la ausencia de levaduras en el medio, se mejora la tasa de hidrólisis durante la misma, aumentándose con ello, la tasa de licuefacción del material (Jørgensen y col., 2007).

Otra manera de conseguir mayores concentraciones finales de sólidos en el medio sin generar problemas de viscosidad excesiva es la realización de los procesos semicontinuos (de inglés, *fed-batch*) (Rudolf y col., 2005; Varga y col., 2004). En estos casos, la adición del sustrato por pulsos implica una hidrólisis continuada del material. En este proceso las enzimas son añadidas junto con el sustrato, lo que provoca una disminución de la viscosidad, favoreciendo el manejo y homogeneización del medio.

Además, los procesos de adición de sustrato por pulsos mejoran la eficiencia del proceso de producción de etanol, permitiendo obtener concentraciones más altas de etanol y mejoras en los rendimientos (Rudolf y col., 2005). Dicha configuración ha sido empleada con éxito a partir de diferentes materias primas como el bagazo de maíz (Varga y col., 2004), paja de trigo (Olofsson y col., 2008), madera de abeto (Rudolf y col., 2005), sorgo dulce (Laopaiboon y col., 2007) o residuos de la industria del papel (Ballesteros y col., 2002).

### 2.3.3. Sacarificación y cofermentación simultáneas

Como ha sido comentado con anterioridad, los materiales lignocelulósicos, en particular las maderas duras y los residuos agrícolas, pueden contener entre 15-30% de pentosas (principalmente xilosa) en su composición. Es por ello que la fermentación de la xilosa es esencial para un eficiente y rentable proceso de producción de etanol.

Los procesos de SFS se realizan normalmente sobre la fracción del RSI, lo que implica la fermentación mayoritariamente de las hexosas. No obstante, dependiendo del grado de integración del proceso, también puede implicar la fermentación de pentosas cuando se utiliza el MPC (prehidrolizado y RSI) en el proceso de SFS. El empleo del MPC y el uso de levaduras fermentadoras de pentosas darían lugar al proceso denominado sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS).

En un proceso en el que las fracciones sólida y líquida se fermentan por separado, se podrían optimizar las condiciones para la fermentación de la glucosa o xilosa en cada una de ellas. Sin embargo, al emplear el MPC, ambos azúcares están presentes en el medio y deben ser fermentados simultáneamente. Como ha sido mencionado previamente, uno de los pasos limitantes en la utilización de la xilosa por parte de *S. cerevisiae* se ha atribuido al ineficiente transporte de la xilosa al interior de la célula. Xilosa y glucosa comparten transportadores de membrana, pero la afinidad de estos sistemas de transporte por la xilosa es aproximadamente 200 veces menor que para la glucosa (Hamacher y col., 2002). Por consiguiente, la presencia de glucosa en el medio inhibe la incorporación de la xilosa al interior de la célula, por lo que los niveles

de glucosa en el medio deben mantenerse bajos para una cofermentación eficiente (Meinander y col., 1999; Chu y Lee, 2007). Así pues, los procesos en semicontinuo en los que el sustrato se añade por pulsos ayudan a mantener bajas las concentraciones de glucosa a lo largo del proceso de SCFS favoreciendo la incorporación de la xilosa (Öhgren y col., 2006b).

En el proceso de SCFS la acumulación de glucosa en el medio es menor que en el caso de HFS, ya que según se va produciendo en la etapa de hidrólisis es transformada a etanol por el microorganismo, lo que resulta favorable para la fermentación de la xilosa (Öhgren y col., 2006b). Además, puesto que los azúcares hemicelulósicos también parecen tener un efecto inhibitorio sobre las celulasas (Xiao y col., 2004), el consumo de la xilosa en un proceso de SCFS implicará mayores rendimientos de HE de la celulosa, aumentando aun más la eficiencia global del proceso de SCFS.

### **2.3.4. Bioproceso consolidado**

El bioproceso consolidado (BPC) conlleva la combinación de las 4 reacciones biológicas necesarias para la transformación de la lignocelulosa a etanol en un único reactor: producción de las enzimas (celulasas y hemicelulasas), hidrólisis del material pretratado a azúcares, fermentación de las hexosas y fermentación de las pentosas (Cardona y Sánchez, 2007; Lynd y col., 2005). Para la consecución de dicho proceso se necesita un único microorganismo, o mezcla de éstos, capaces de hidrolizar y fermentar la biomasa pretratada sin adición de enzimas exógenas.

Entre los microorganismos capaces de degradar la celulosa, las bacterias celulolíticas del género *Clostridium* han sido las mejor estudiadas y caracterizadas. Estas bacterias digieren la celulosa mediante un complejo enzimático extracelular llamado celulosoma (Demain y col., 2005). Los celulosomas son capaces de hidrolizar tanto la parte amorfa como la parte cristalina de la celulosa. *Clostridium thermocellum*, es una bacteria termófila que utiliza la celulosa como única fuente de carbono y lleva a cabo la fermentación produciendo lactato, acetato, etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Además, *C.*

## 2. INTRODUCCIÓN

---

*thermocellum*, expresa su celulosoma unido firmemente a la pared de la célula y presenta las velocidades más altas de hidrólisis de celulosa conocidas hasta el momento (Lynd y col., 2002). Por todo ello, *C. thermocellum* puede producir la enzima, realizar la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa a etanol. Puesto que *C. thermocellum* no es capaz de fermentar la xilosa, la fermentación de las pentosas se realiza con *Clostridium thermosaccharolyticum* lo que permite la cofermentación simultánea de glucosa y xilosa a etanol en un mismo reactor.

A pesar de todas las ventajas que implicaría la realización de este tipo de BPC, en la actualidad todavía no existen microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente BPC. Sin embargo, existen expectativas de poder superar las limitaciones de los actuales microorganismos mediante dos estrategias. La primera está orientada a manipular microorganismos que muestran una alta actividad celulolítica con el fin de mejorar su producción de etanol, aumentando los rendimientos o la tolerancia al mismo (Lynd y col., 2005). La segunda contempla la modificación genética de microorganismos que presentan altos rendimientos a etanol de manera que sean capaces de producir enzimas para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa (Van Zyl y col., 2007). Dichos avances podrían implicar importantes mejoras en el proceso de producción de bioetanol en un futuro pero se encuentran todavía en una etapa inicial de investigación.

La bacteria *Clostridium phytofermentans*, aislada del suelo en 2002, es capaz de hidrolizar una amplio rango de materiales entre los que se encuentran los residuos lignocelulósicos debido a la síntesis de sus propias enzimas, y de fermentar una amplio rango de azúcares tanto hexosas como pentosas (Warnick y col., 2002). En ese sentido, se están realizando diversas investigaciones para optimizar la producción de etanol con este microorganismo a partir de una materia prima concreta, aumentando los rendimientos globales tanto de hidrólisis como de fermentación (QTEROS, 2009).

En la siguiente tabla 2.3 se resumen las principales características de los diferentes procesos detallados en el presente capítulo.

**Tabla 2.3. Descripción de las diferentes configuraciones de proceso con diferentes niveles de integración.**

	HFS	SFS	SCFS	BPC
CARACTERÍSTICAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Las enzimas hidrolizan las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa.</li> <li>-La glucosa resultante es convertida a etanol en el paso posterior de fermentación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las enzimas hidrolizan la celulosa y el microorganismo convierte simultáneamente la glucosa resultante a etanol.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las enzimas hidrolizan la celulosa y simultáneamente el microorganismo convierte la glucosa resultante a etanol.</li> <li>- La xilosa solubilizada en el hidrolizado es también fermentada a etanol.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conversión de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos a etanol por un único microorganismo o mezcla de éstos.</li> </ul>
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Condiciones óptimas para cada paso.</li> <li>-Posibilidad de reciclaje de las células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Amplia disponibilidad de microorganismos eficientes para este tipo de procesos.</li> <li>-Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas.</li> <li>- Se minimiza la inhibición por producto final.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aprovechamiento de la mayoría de azúcares presentes en la materia prima.</li> <li>-Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas.</li> <li>- Se minimiza la inhibición por producto final.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No se necesita la adición de enzimas para realizar la hidrólisis.</li> </ul>
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proceso en dos pasos con el consiguiente aumento de costes que ello supone.</li> <li>- Inhibición por producto final durante la hidrólisis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación.</li> <li>- Imposibilidad de reciclaje de las células.</li> <li>- No hay fermentación de las pentosas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los microorganismos fermentadores de pentosas no están ampliamente desarrollados.</li> <li>- Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación.</li> <li>- Imposibilidad de reciclaje de las células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente proceso.</li> </ul>



### **3. OBJETIVO E HIPÓTESIS**



### 3. OBJETIVO E HIPÓTESIS

El presente trabajo se enmarca dentro de las actividades de la Unidad de Biomasa del CIEMAT que tienen como objetivo la producción de biocombustibles líquidos a partir de biomasa lignocelulósica. Estos biocombustibles, denominados de segunda generación, aparecen como una alternativa prometedora a los actuales biocombustibles de primera generación provenientes de materias primas azucaradas, amiláceas y oleaginosas, de elevado coste y ligadas al mercado alimentario. Entre las diferentes tecnologías que se están desarrollando para la producción de biocarburantes de segunda generación, los procesos de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica basados en hidrólisis enzimática, son los que ofrecen mejores perspectivas de comercialización (Ballesteros, 2001).

La paja de trigo, materia prima empleada en este trabajo, es un abundante residuo agrícola en España, cuya producción en 2007 se estimó en más de 7 millones de toneladas (FAOSTAT, 2007). Al ser un residuo abundante, con alto contenido en celulosa, es un sustrato interesante como materia prima en los procesos de producción de etanol mediante hidrólisis enzimática y fermentación (Alfani y col., 2000; Olsson y col., 2006).

Debido a su compleja estructura, el material lignocelulósico tiene baja susceptibilidad al ataque enzimático, por lo que hace necesario un paso previo de pretratamiento. La explosión por vapor es un excelente pretratamiento para el material lignocelulósico ya que altera la estructura del material, aumentando la accesibilidad de las enzimas. Sin embargo, durante el pretratamiento se forman una serie de productos de degradación que pueden afectar a la enzima y al microorganismo, actuando como inhibidores de la hidrólisis y fermentación. Dichos compuestos de degradación, junto con los azúcares hemicelulósicos, se encuentran solubles en la fracción líquida o prehidrolizado. Por eso en los procesos desarrollados hasta este momento, se realiza una separación de la fracción líquida y una etapa de lavado del residuo sólido insoluble (RSI) para eliminar los posibles inhibidores embebidos en dicha fracción. No obstante, con objeto de minimizar las necesidades de agua, disminuir la cantidad de efluentes producidos en el proceso y aprovechar todos los azúcares hemicelulósicos solubilizados,

sería interesante utilizar el material pretratado completo (MPC) como medio de hidrólisis y fermentación.

Dentro de las mejoras necesarias para avanzar hacia la comercialización del proceso de producción de bioetanol, la simplificación del mismo, con una mayor integración de todas las etapas, es la que ofrece mejores perspectivas. La integración de las etapas de proceso implica tener una visión global del pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación, ya que cada una de estas etapas tiene una repercusión importante en la siguiente. La eliminación de la etapa de filtración, la combinación de la hidrólisis y fermentación en un único proceso y la cofermentación de pentosas y hexosas pueden contribuir significativamente a reducir los costes de la tecnología. Esta reducción del coste del proceso global es necesaria para implementar la tecnología de producción de etanol a partir de lignocelulosa a nivel industrial.

Durante las últimas décadas se han producido grandes progresos en la reducción de los costes de las tecnologías de producción de bioetanol basadas en hidrólisis enzimática. La clave de estos avances ha estado en aumentar los rendimientos, las velocidades de producción y las concentraciones de etanol mediante mejoras en la tecnología de pretratamiento, desarrollo de mejores enzimas celulolíticas y la combinación sinérgica de la hidrólisis y fermentación.

En base a estas consideraciones, el objetivo principal de esta investigación es obtener una mayor integración de todas las etapas implicadas en el proceso de producción de etanol a partir de paja de trigo, aprovechando tanto la glucosa como xilosa presentes en la materia prima con el fin de obtener altos rendimientos de etanol.

Para la consecución del objetivo general se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Análisis del efecto de las preparaciones enzimáticas comerciales empleadas en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) sobre el microorganismo etanológico.
- Comparación de los procesos de producción de etanol mediante hidrólisis y fermentación separadas (HFS) y SFS.

- Integración de procesos mediante el uso del material pretratado completo (MPC) en procesos de SFS y sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS).
- Realización de pruebas de SFS y SCFS en semicontinuo (*fed-batch*).
- Empleo de microorganismos termotolerantes en procesos de SFS en continuo o semicontinuo.
- Adaptación de la levadura a la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento con el fin de aumentar la tolerancia a los productos de degradación y favorecer el consumo de xilosa.



## **4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS** **RESULTADOS**



## 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

La presente Tesis Doctoral está constituida por las publicaciones detalladas a continuación que serán referenciadas en el texto por sus correspondientes números romanos. Todas las publicaciones se incluyen en el anexo de la Tesis Doctoral.

- I. Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M y Olsson L. Comparison of SHF and SSF Processes From Steam-Exploded Wheat Straw for Ethanol Production by Xylose Fermenting and Robust Glucose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Biotechnology and Bioengineering*, **100**: 1122-1131, 2008.  
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/117928544/abstract>
- II. Tomás-Pejó E, Oliva JM y Ballesteros M. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **67**: 874-884, 2008.  
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2416/1/JSIR%2067\(11\)%20874-884.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2416/1/JSIR%2067(11)%20874-884.pdf)
- III. Tomás-Pejó E, García-Aparicio M, Negro MJ, Oliva JM y Ballesteros M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*, **100**: 890-895, 2009.
- IV. Tomás-Pejó E, Oliva JM, González A, Ballesteros I y Ballesteros M. Bioethanol production from wheat straw by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel*, **88**: 2142-2147, 2009.
- V. Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M y Olsson L. Adaptation of xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production at high substrate loading. *Bioresource Technology*. 2009. *Enviado para su publicación*.

## 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

A continuación se discuten conjuntamente los resultados obtenidos, realizando una comparación de los diferentes estudios realizados y la deducción de conclusiones globales.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se esquematiza en la figura 4.1. En ella se resumen los principales procesos de fermentación, SFS y SCFS realizados con diferentes cepas de levaduras etanológicas: *S. cerevisiae* Red Star, cepa disponible comercialmente; *S. cerevisiae* F12, cepa recombinante capaz de fermentar la xilosa y *K. marxianus* CECT 10875, levadura termotolerante capaz de fermentar a temperaturas superiores a 40 °C.

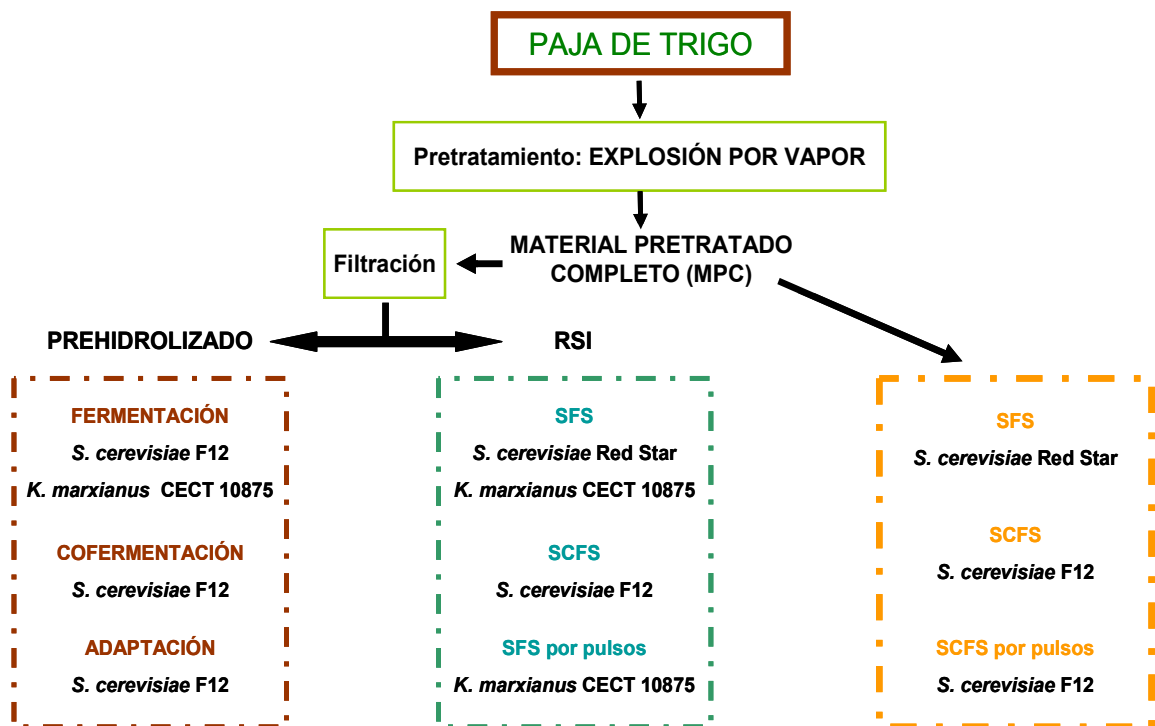


Figura 4.1. Esquema simplificado de los procesos experimentales llevados a cabo.

### 4.1. COMPOSICIÓN DEL MATERIAL

La caracterización de la paja de trigo se realizó siguiendo el esquema mostrado en la figura 4.2 utilizando los métodos del National Renewable Energy Laboratory (NREL) (USA) para la determinación de carbohidratos estructurales, cenizas y lignina

en biomasa lignocelulósica (LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-017 y LAP-019) (NREL, 2007).

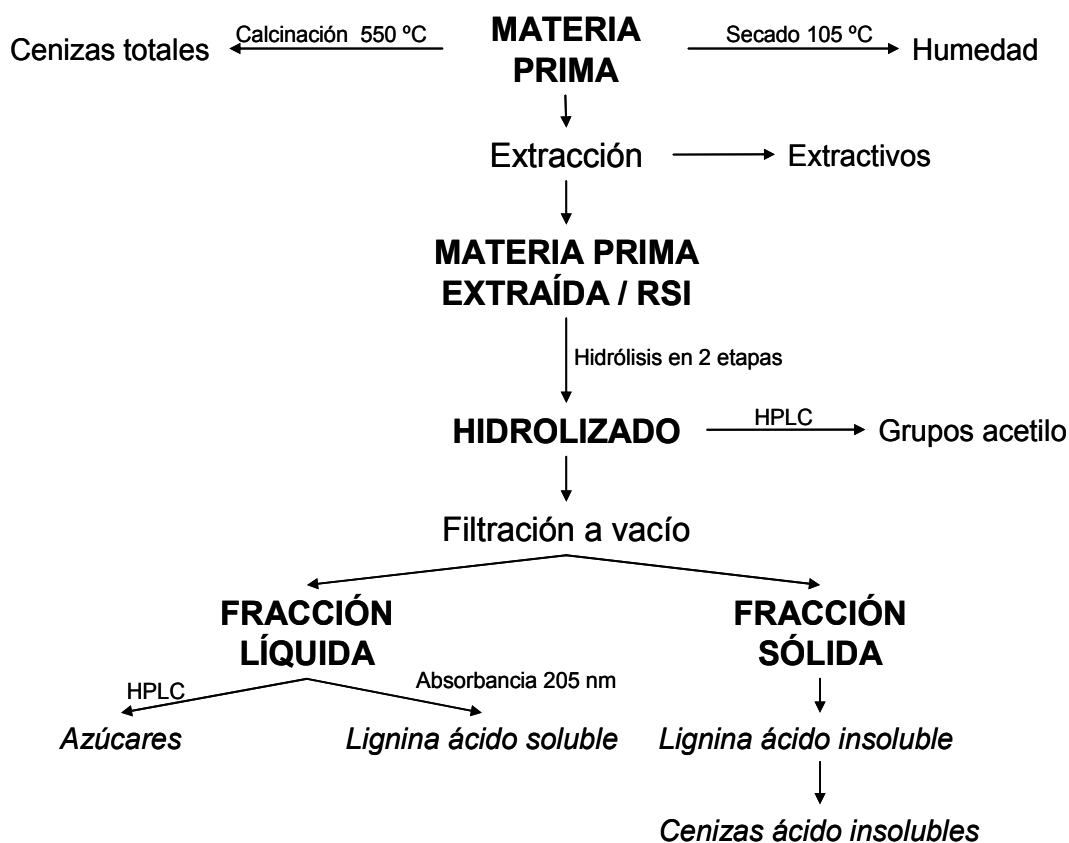


Figura 4.2. Procedimiento para el análisis de la paja de trigo y del material pretratado.

Los procedimientos empleados para establecer la composición, tanto de la materia prima como del RSI, determinan el contenido en azúcares monoméricos. Se asume que la glucosa proviene de la celulosa, que la xilosa, arabinosa y galactosa provienen de la hemicelulosa y que todos los azúcares están en forma polimérica. Es por ello que el contenido en celulosa y hemicelulosa se calculó aplicando el factor de corrección correspondiente a la ganancia de peso por la adición de una molécula de agua al hidrolizar los enlaces glucosídicos (1,11 en el caso de las hexosas y 1,13 en el caso de las xilosas).

La composición de las diferentes pajas de trigo empleadas en la experimentación, junto con otros encontrados en la bibliografía, se detallan en la tabla 4.1. Como se

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

observa, el contenido en celulosa (30,2-40,7%) y hemicelulosa (22,3-28,3%) varía entre los diferentes lotes. La composición en carbohidratos estructurales y lignina de paja de trigo puede variar debido al fertilizante empleado durante su cultivo y el contenido en minerales del suelo o a la madurez que haya alcanzado en grano en el momento de su recolección (Öhgren y col., 2006a). El alto contenido en carbohidratos estructurales hace de este residuo un sustrato potencialmente interesante para la producción de etanol.

**Tabla 4.1. Composición de la paja de trigo empleada como materia prima (% peso seco).**

	Artículo I	Artículo IV	(Pérez y col., 2008)	(Pérez y col., 2007)
<b>Celulosa</b>	30,2	40,7	37,8	37,4
<b>Hemicelulosa</b>	22,3	27,6	25,4	28,3
<b>Xilano</b>	18,7	23,7	22,8	27,0
<b>Galactano</b>	0,8	2,6	1,0	1,1
<b>Arabinano</b>	2,8	1,3	1,6	1,6
<b>Grupos acetilo</b>	2,6	n.d.	1,6	1,8
<b>Lignina</b>	17,0	17,0	18,1	17,4
<b>Cenizas</b>	4,7	4,3	6,3	4,8
<b>Extractivos</b>	14,7	n.d.	15,3	14,7

n.d.; no determinado

La fracción hemicelulósica está formada principalmente por xilano (18,7-27,0%), siendo ésta una de las características de las plantas herbáceas ya que el arabinoxilano es el componente principal de su hemicelulosa. Puesto que la xilosa supone aproximadamente entre el 20% y el 30% de los azúcares contenidos en la paja de trigo, su transformación a etanol puede contribuir a aumentar de manera sensible los rendimientos del proceso. También forman parte de la hemicelulosa pequeñas cantidades de galactano y arabinano. En el análisis de la fracción hemicelulósica de la materia prima se determinaron los grupos acetilo, presentes como sustituyentes de las cadenas de arabinoxilanos, los que representan entre un 1,6% y un 2,6% del peso seco de la materia prima.

El contenido en lignina de la paja de trigo (17,0-18,1%) se encuentra en el rango descrito para otros residuos agrícolas como el bagazo de maíz (Kim y Holtzaple, 2005) o la paja de cebada (García-Aparicio y col., 2007). Los extractivos suponen entre el 14,7-15,3% del peso seco y el relativamente alto contenido en cenizas (4,3-6,3%) puede estar justificado por la presencia de compuestos derivados del uso de fertilizantes en los

cultivos y por compuestos de sílice procedentes de la contaminación del suelo durante la cosecha y el transporte (Olanders y Steenari, 1995).

### **4.1.1. Efecto del pretratamiento en la composición del material pretratado**

La primera etapa en un proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de material lignocelulósico es el pretratamiento, que tiene como objetivo principal alterar la compleja estructura de la biomasa lignocelulósica aumentando la accesibilidad de las enzimas. En este trabajo se empleó el pretratamiento por explosión por vapor (EV) que combina un efecto químico o autohidrólisis con un efecto mecánico. Éste último está causado por la rápida despresurización del reactor que provoca una evaporación del agua que impregna la biomasa, creando fuerzas de cizalla que dan lugar a la separación de las fibras.

Como resultado del pretratamiento se origina un producto fibroso, a partir del cual, tras un proceso de filtración se obtienen dos fracciones: un RSI enriquecido en celulosa y lignina, y una fracción líquida o prehidrolizado, donde se recuperan parte de los azúcares hemicelulósicos solubilizados durante el pretratamiento, así como diferentes productos de degradación originados en el mismo.

Las variables más importantes en el pretratamiento por EV son la temperatura, el tiempo de residencia, el contenido en humedad del material y el tamaño de partícula (Ballesteros y col., 2002b Duff y Murray, 1996). A la hora de evaluar el pretratamiento ha de tenerse en cuenta una serie de factores como la recuperación de celulosa en el RSI, el rendimiento de hidrólisis enzimática del mismo y la recuperación de azúcares hemicelulósicos (principalmente xilosa) en la fracción líquida. Al aumentar la severidad del pretratamiento (mayor temperatura y tiempo de residencia) aumenta la solubilización de las hemicelulosas haciéndose la celulosa más accesible al ataque enzimático. Sin embargo, si se utilizan condiciones de pretratamiento demasiado severas se produce una degradación de los azúcares hemicelulósicos solubilizados en la fracción líquida e incluso una degradación de la celulosa, originándose una serie de productos tóxicos que van a afectar a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación. Por lo tanto, a la hora de seleccionar las condiciones de pretratamiento

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

hay que alcanzar una solución de compromiso entre las condiciones que favorecen la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático y las que favorecen la recuperación de azúcares hemicelulósicos con una mínima generación de productos tóxicos.

La temperatura de pretratamiento utilizada en los experimentos de esta Tesis Doctoral se encuentra en el rango 200-220 °C y el tiempo de residencia varía entre 2,5 y 5 min. El material fue molido antes del pretratamiento utilizándose en los ensayos dos tamaños de partícula de 5 y 10 mm. El primer paso para una eficiente integración de proceso consiste en fijar las condiciones de pretratamiento en función de la configuración elegida para la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los azúcares (tanto glucosa como xilosa) a etanol. De este modo, cuando se realizó un proceso de SFS con *K. marxianus* (**artículo IV**), y puesto que esta levadura no tiene la capacidad de fermentar xilosa, se eligieron condiciones de pretratamiento (220 °C, 2,5 min) en las que se obtuvo un RSI con alto contenido en celulosa aunque la recuperación de la xilosa en el prehidrolizado no fuera óptima debido a la degradación de la misma. Sin embargo, cuando se utilizó una levadura recombinante capaz de fermentar tanto glucosa como xilosa (**artículos I y V**) se utilizaron condiciones de pretratamiento más suaves (200-210 °C, 5 min) que condujeron a una mayor recuperación de xilosa en el prehidrolizado.

En la tabla 4.2 se detallan las composiciones de los diferentes RSI y prehidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de pretratamiento de la paja de trigo. En cuanto a la composición del RSI, se puede observar que para todas las condiciones de pretratamiento empleadas el contenido en celulosa y lignina fue mayor que en la materia prima debido a la solubilización de la fracción hemicelulósica. Así, mientras que el contenido en celulosa de la paja de trigo variaba entre 30,2-40,7%, en el RSI la concentración de celulosa varió entre 51,8-72,0%. El RSI con mayor contenido en celulosa (72%) fue el obtenido cuando el pretratamiento se realizó a 220 °C durante 2,5 min (**artículo IV**). Del mismo modo, en el RSI se observó un contenido en lignina (21,4-29,9%) superior que en la materia prima (17,0-18,1%) en todas las condiciones de pretratamiento empleadas.

Como puede observarse en el **artículo V**, para el material molido al mismo tamaño de partícula (5 mm), un aumento de la temperatura de pretratamiento originó una mayor solubilización de los xilanos, recuperándose una cantidad menor en el RSI

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

(10,9% frente a un 3,5%, cuando la temperatura de pretratamiento fue de 200 °C y 210 °C, respectivamente). Cabe destacar que en este caso, el pretratamiento realizado a 210 °C fue demasiado severo, puesto que el RSI contenía menor proporción de celulosa que el pretratado a 200 °C (56% frente a 60%) y se observó una mayor concentración de productos de degradación en el prehidrolizado.

**Tabla 4.2. Composición de los materiales pretratados obtenidos a diferentes condiciones de pretratamiento por EV.**

	Artículo I	Artículo IV	Artículo V	
<b>CONDICIONES PRETRATAMIENTO</b>				
TEMPERATURA (°C)	210	220	200	210
TIEMPO (min)	5	2,5	5	5
TAMAÑO DE PARTÍCULA (mm)	≈ 10	≈ 10	< 5	< 5
<b>RESIDUO SÓLIDO INSOLUBLE</b>				
CELULOSA (% p/p)	51,8 (26,5)*	72,0 (38,2)	60,1 (31,3)	56,4 (29,3)
HEMICELULOSA XILANO (% p/p)	10,5 (5,4)	7,0 (3,7)	10,9 (5,7)	3,5 (1,8)
LIGNINA (% p/p)	28,6 (14,6)	21,4 (11,1)	29,9 (15,5)	29,2 (14,9)
CENIZAS (% p/p)	1,8	0,1	1,2	3,2
<b>FRACCIÓN LÍQUIDA</b>				
<b>Azúcares:</b>				
GLUCOSA (g/l)	5,7	2,9	5,0	3,6
XILOSA (g/l)	24,7	17,8	33,0	15,6
ARABINOSA (g/l)	1,6	1,2	0,6	0,6
GALACTOSA (g/l)	1,1	0,6	1,1	1,1
<b>Productos de degradación y ác. acético:</b>				
FURFURAL (g/l)	1,4	1,8	1,4	1,6
HMF (g/l)	0,1	0,4	0,3	0,4
ÁCIDO ACÉTICO (g/l)	5,1	6,4	5,2	6,8
ÁCIDO FÓRMICO (g/l)	1,3	2,6	2,1	2,8
ÁCIDO CUMÁRICO (g/l)	<0,01	0,03	0,04	0,05
ÁCIDO FERÚLICO (g/l)	<0,1	0,02	0,05	0,07

\* Entre paréntesis se expresa la composición referida a la materia prima (composición del material pretratado por porcentaje de recuperación).

El efecto que el tamaño de partícula ejerce sobre la composición del material pretratado se puede observar al comparar la composición de los RSI en el **artículo I** y **artículo V**, ambos pretratados a 210 °C durante 5 min pero con tamaño de partícula diferente (5 y 10 mm). Teniendo en cuenta el contenido en celulosa de la materia prima y el porcentaje de recuperación de sólidos (aproximadamente 52%), se puede apreciar

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

que en los ensayos con un tamaño de partícula de 10 mm se recuperó en el RSI el 91% de la celulosa contenida en la materia prima, mientras que la recuperación sólo fue del 72% cuando el tamaño de partícula fue <5 mm. Del mismo modo, la recuperación de hemicelulosa (xilanos) en el RSI fue más alta al utilizar un tamaño de partícula mayor (30% y 7,5% al emplear 10 mm y 5 mm, respectivamente). El mismo efecto del tamaño de partícula sobre la recuperación y solubilización de las fracciones celulósica y hemicelulósica se observó al pretratar madera de pino o residuos agrícolas herbáceos (*Brassica carinata*) por EV (Ballesteros y col., 2000; Ballesteros y col., 2002b).

La fracción líquida o prehidrolizado está constituida mayoritariamente por los azúcares solubilizados procedentes de la fracción hemicelulósica y por los productos de degradación originados durante el pretratamiento. La proporción de los azúcares solubilizados varía dependiendo del tipo de azúcar y de las condiciones de pretratamiento (Ballesteros y col., 2002b. Concentraciones de 5,0 g/l y 3,6 g/l de glucosa y de 33,0 g/l y 15,6 g/l de xilosa se detectaron en los prehidrolizados obtenidos a 200 °C y 210 °C durante 5 min, respectivamente (**artículo V**). Como puede observarse, un incremento tanto en el tiempo de residencia como en la temperatura de pretratamiento promueve una mayor degradación de los azúcares. Independientemente de las condiciones de pretratamiento empleadas, la solubilización de la galactosa y la arabinosa fue del 100%, no encontrándose entre los azúcares del RSI en ningún caso.

Durante el pretratamiento se originan una serie de productos de degradación potencialmente inhibidores para las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación. En la tabla 4.2 se recoge la concentración de los productos de degradación mayoritarios presentes en los prehidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de pretratamiento. La concentración de los compuestos de degradación aumenta con la temperatura y el tiempo de pretratamiento. Así pues, como se ha comentado con anterioridad, en el caso de los materiales utilizados en el **artículo V**, la concentración de los mismos fue siempre superior en la fracción líquida del material pretratado a 210 °C.

El ácido acético, originado a partir de la hidrólisis de los grupos acetilo de la fracción hemicelulósica, fue el compuesto mayoritario en todos los casos. Su concentración aumentó cuanto mayor fue la temperatura de pretratamiento (5,2 g/l a 200 °C y 6,8 g/l a 210 °C) (**artículo V**). Estas concentraciones están dentro del rango

encontrado en la bibliografía en prehidrolizados obtenidos a partir de paja de trigo pretratada por EV. El segundo compuesto, en cuanto a su concentración en la fracción líquida, fue el ácido fórmico (1,3-2,8 g/l) que proviene de la degradación que se produce a elevadas temperaturas del furfural y HMF.

La concentración de furfural varió entre 1,4 y 1,8 g/l. Este compuesto proviene de la degradación de las pentosas, xilosa mayoritariamente. No obstante, esas concentraciones de furfural sólo explican parcialmente la degradación de pentosas durante el pretratamiento. Al ser un compuesto volátil, es posible que ocurran pérdidas por evaporación y recondensación durante el pretratamiento (Allen y col., 2001; Laser y col., 2002).

El otro derivado furánico detectado fue el HMF, que se origina como consecuencia de la degradación de las hexosas. El HMF se encontró en menor concentración que el furfural debido a que las hexosas presentes en la hemicelulosa son minoritarias en los materiales herbáceos. Las concentraciones de ambos compuestos en prehidrolizados de otras biomásas herbáceas, pretratadas por EV en condiciones similares, son muy parecidas. Por ejemplo, en el bagazo de maíz se encontraron 0,2 g/l de HMF y 1,3-1,5 g/l de furfural (Öhgren y col., 2006b; Öhgren y col., 2007) y en el caso de la paja de cebada se detectaron 0,2 g/l de HMF y 1,1 g/l de furfural (Linde y col., 2007).

Entre los productos de degradación de la lignina, el ácido cumárico y el ácido ferúlico se encontraron en unas concentraciones de entre <0,01 y 0,07 g/l. Ambos derivan del ácido cinámico y son característicos de los materiales herbáceos donde actúan de unión entre la hemicelulosa y la lignina (Sun y Cheng, 2002).

En general, todos los compuestos de degradación mencionados han sido identificados previamente, dentro del mismo rango de concentraciones, en prehidrolizados obtenidos a partir de bagazo de maíz (Öhgren y col., 2005), paja de cebada (García-Aparicio y col., 2006) y paja de trigo (Oliva y col., 2003).

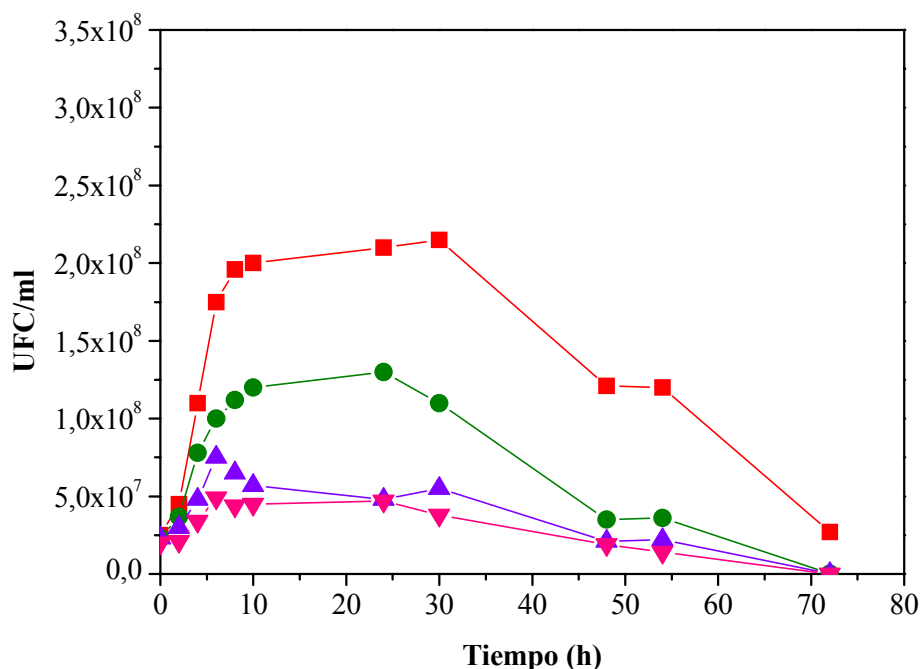
### **4.2. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS**

El proceso SFS se ha mostrado como un método viable y eficaz para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. La presencia del microorganismo fermentador en el mismo reactor donde se realiza la HE evita la acumulación de glucosa y celobiosa en el medio, impidiendo así la inhibición por producto final del sistema enzimático (Olsson y col., 2005). Esto se traduce en mayores rendimientos de HE y mayores rendimientos y productividades volumétricas de etanol.

En un proceso de SFS la producción de las enzimas empleadas puede llegar a suponer el 50% del coste total del proceso (Galbe y Zacchi, 2002). Por ello es sumamente importante para la viabilidad económica del proceso optimizar la carga enzimática. Además se ha observado que, la presencia de productos conservantes en los preparados enzimáticos comerciales empleados para estabilizar la enzima puede ejercer algún efecto inhibitorio sobre la levadura (Golias y col., 2000; Szoczdrak y Targonsky, 1987). Así pues, debería ajustarse la concentración dentro de los rangos en que no exista este efecto inhibitorio. En ese contexto se llevaron a cabo los experimentos del **artículo III**, en los que se estudió el efecto que diferentes dosis de enzima comercial Celluclast 1.5 L FG (5-35 UPF/g sustrato) tienen sobre la viabilidad celular y producción de etanol de *K. marxianus* CECT 10875 en procesos de SFS con 10% (p/v) de celulosa comercial (Sigmacell 50, SIGMA). Los experimentos se realizaron a 42 °C, pH 5,0, durante 72 h con una dosis de inóculo de 0,3 g/l peso seco.

La viabilidad celular en los diferentes ensayos se muestra en la figura 4.3. Al emplear dosis de enzima de entre 5-15 UPF/g sustrato, el mayor número de UFC/ml se alcanzó entre las 20-24 h. Por el contrario, al emplear dosis de 25-35 UPF/g sustrato las máximas UFC/ml se alcanzaron entre 6-8 h. En ambos casos se produjo un marcado descenso en la viabilidad celular tras 25-30 h de SFS. En la figura se observa que el mayor número de UFC/ml ( $2,2 \times 10^8$ ) se obtuvo cuando se utilizó la menor dosis de enzima (5 UPF/g sustrato). La viabilidad celular se redujo sensiblemente al emplear las dosis de enzima más altas (25-35 UPF/g sustrato). Es decir, mayores concentraciones de enzima, que implican mayores concentraciones de aditivos y conservantes, afectaron

negativamente el número de UFC/ml tal como había sido demostrado previamente en procesos de fermentación de glucosa y de SFS (Golias y col., 2000; Szoczdrak y Targonsky, 1987).



**Figura 4.3.** Viabilidad celular de *K. marxianus* CECT 10875 en procesos de SFS con 10% (p/v) de celulosa cristalina (Sigmacell 50, SIGMA). Las diferentes cargas de enzima fueron: (■) 5 (●) 15; (▲) 25; y (▼) 35 UPF/g sustrato.

Según se observa en la tabla 4.3, la producción de etanol en los procesos de SFS con celulosa comercial y diferentes dosis de enzima aumentó de 25,9 a 33,9 g/l al utilizar 5 y 15 UPF/g sustrato respectivamente, lo que significó una mejora del rendimiento del 0,27 al 0,35. No se vieron diferencias significativas en la concentración máxima ni en los rendimientos de etanol al emplear mayores cargas de enzima (25-35 UPF/g sustrato). Cabría esperar que un aumento en la dosis enzimática diera lugar a una mayor concentración de etanol en un proceso de SFS; no obstante, estudios previos han concluido que existe un punto por encima del cual al aumentar la dosis enzimática no se observan mejoras en la producción de etanol (Stenberg y col., 2000; Varga y col., 2004).

La mayor concentración de glucosa detectada en el medio durante las primeras 4 h de proceso, fue de 12,9 g/l y se alcanzó con 35 UPF/g sustrato (tabla 4.3). Esto indicó una mayor tasa de HE a tiempos cortos al emplear dosis de enzima más altas, aunque

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

esa mejor tasa de hidrólisis inicial no se tradujo en mayores concentraciones finales de etanol.

**Tabla 4.3. Concentración de glucosa, rendimiento y producción de etanol, y máximo número de UFC/ml en procesos de SFS con 10% (p/v) de celulosa cristalina Sigmacell 50 y diferentes cargas de enzima (5-35 UPF/g sustrato).**

	10% p/v Sigmacell 50			
	5 UPF/g sustrato	15 UPF/g sustrato	25 UPF/g sustrato	35 UPF/g sustrato
<b>Glucosa máx. (g/l)<sup>(1)</sup></b>	2,4	6,8	11,5	12,9
<b>UFC/ml máx.</b>	2,2 x10 <sup>8</sup>	1,3 x10 <sup>8</sup>	0,8 x10 <sup>8</sup>	0,5 x10 <sup>8</sup>
<b>EtOH máx. (g/l)</b>	25,9	33,9	34,7	33,6
<b>Rto<sub>EtOH/G</sub> (g/g)<sup>(2)</sup></b>	0,27	0,35	0,36	0,35

- (1) La concentración máxima de glucosa fue detectada entre las 2-4 h, en la fase inicial de crecimiento del microorganismo.
- (2) Rendimiento de etanol calculado como el etanol producido por los gramos de glucosa disponible en la celulosa cristalina Sigmacell 50.

Así pues, debido al efecto negativo que los conservantes presentes en las preparaciones enzimáticas pueden tener sobre la viabilidad celular, entendiendo que existen dosis de enzimas por encima de las cuales no aumenta la producción de etanol y considerando el elevado coste de producción de las enzimas, es necesario determinar las dosis mínimas de enzima con las que puedan obtenerse buenos rendimientos para cada configuración de proceso. Para los experimentos posteriores de SFS/SCFS se eligió una dosis de enzima de 15 UPF/g celulosa ya que dosis mayores no implicaron mejoras en las concentraciones de etanol. Además, esta dosis se encontraba dentro del rango de las empleadas para otros materiales lignocelulósicos (Linde y col., 2007; Ruiz y col., 2006).

En los procesos de SFS no se acumulan los productos de hidrólisis, por lo que en principio se pueden emplear altas cargas de sustrato que conducen a mayores concentraciones de etanol. No obstante, en un proceso convencional de SFS el contenido inicial de sustrato suele estar limitado debido a la falta de fluidez de las mezclas del material pretratado y el agua, lo cual crea problemas de mezcla y difusión en el reactor haciendo el medio difícil de homogeneizar. Una alternativa para superar los problemas causados por la alta viscosidad del medio, sobre todo en las primeras

horas de proceso, es realizar una etapa previa de prehidrólisis o presacarificación. La prehidrólisis, en la que las enzimas actúan hidrolizando el sustrato antes de la inoculación con las levaduras, hace el medio más fluido y más fácil de manejar, permitiendo utilizar cargas de sustrato más elevadas. En todos los experimentos de SFS con el RSI lavado se realizó una etapa previa de prehidrólisis a 50 °C ya que es la temperatura óptima de las celulasas empleadas. La duración de la presacarificación se fijó en 8 h de acuerdo a estudios previos, ya que etapas de presacarificación más largas (entre 16-24 h) resultan en una disminución de los rendimientos de etanol (Öhgren y col., 2007). La desactivación de las celulasas es dependiente del tiempo y la temperatura. Por ello, en procesos de SFS precedidos de prehidrólisis largas donde las enzimas están sometidas a temperaturas altas durante largos periodos de tiempo, pueden producirse fenómenos de desactivación enzimática (Öhgren y col., 2007; Tengborg y col., 2001).

Como se ha comentado con anterioridad, el microorganismo más comúnmente utilizado en procesos de fermentación alcohólica es *S. cerevisiae* debido a su alta tolerancia al etanol, a los tóxicos producidos en el pretratamiento y a que presenta rendimientos de etanol cercanos al máximo teórico (0,51 g/g). Así pues, se utilizó la cepa industrial *S. cerevisiae* Red Star en procesos de SFS a 32 °C con el RSI lavado de paja de trigo pretratada y una carga inicial de sustrato de 10% (p/v) (**artículo I**). Las dosis enzimáticas empleadas en todos los experimentos de SFS fueron de 15 UPF/g de celulosa en el caso del cóctel de celulasas (Celluclast 1.5 L FG) y 15 UI/g celulosa de  $\beta$ -glucosidasa (NS50010), que como se ha comentado con anterioridad se encuentran en el rango de las empleadas para otros materiales lignocelulósicos (Linde y col., 2007; Ruiz y col., 2006).

Puesto que la producción del inóculo puede suponer alrededor de 5% del coste total de la SFS (Galbe y Zacchi, 2002), una disminución del tamaño del mismo implicaría también una disminución en el coste de proceso. El tamaño de inóculo en todos los ensayos de SFS se fijó en 1 g/l de peso seco de levaduras, siendo éste considerado un volumen de inóculo relativamente bajo y dentro del rango (1-2 g/l) por encima del cual no existe una relación positiva entre tamaño de inóculo y rendimiento de etanol (Olofsson y col., 2008b).

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Cabe destacar, que el RSI obtenido tras el pretratamiento en el **artículo I** fue sometido a un secado previo a la SFS durante 90 h a 50 °C. El proceso de secado puede originar una alteración de la estructura de los poros del material pretratado, disminuyendo la susceptibilidad del material al ataque enzimático y reduciendo así los rendimientos de SFS (Esteghlalian y col., 2001; Hendriks y Zeeman, 2009). Por ello, el RSI sin secar fue empleado en todos los procesos de SFS posteriores.

El perfil de SFS con *S. cerevisiae* Red Star y 10% (p/v) de RSI a lo largo de 120 h se muestra en la figura 4.4. Como se puede observar, la concentración de glucosa en el momento de inoculación fue de aproximadamente 10 g/l debido a la acción de las enzimas durante la prehidrólisis. La glucosa fue rápidamente consumida por la levadura durante las primeras 10 h de proceso lo que se vio reflejado en un aumento rápido de la producción de etanol, alcanzándose alrededor de 8 g/l, que correspondían a un 70% del total. No obstante, debido a la incapacidad de fermentar xilosa por parte de *S. cerevisiae* Red Star la concentración de xilosa permaneció constante a lo largo de todo el proceso, siendo la concentración final de aproximadamente 3,5 g/l. Aunque se observó un marcado aumento en la producción de etanol durante las primeras 20 h de proceso la concentración de etanol máxima (11,2 g/l) se alcanzó entre las 30-40 h, coincidiendo con un descenso de la tasa de HE en el proceso de SFS (Sun y Cheng, 2002).

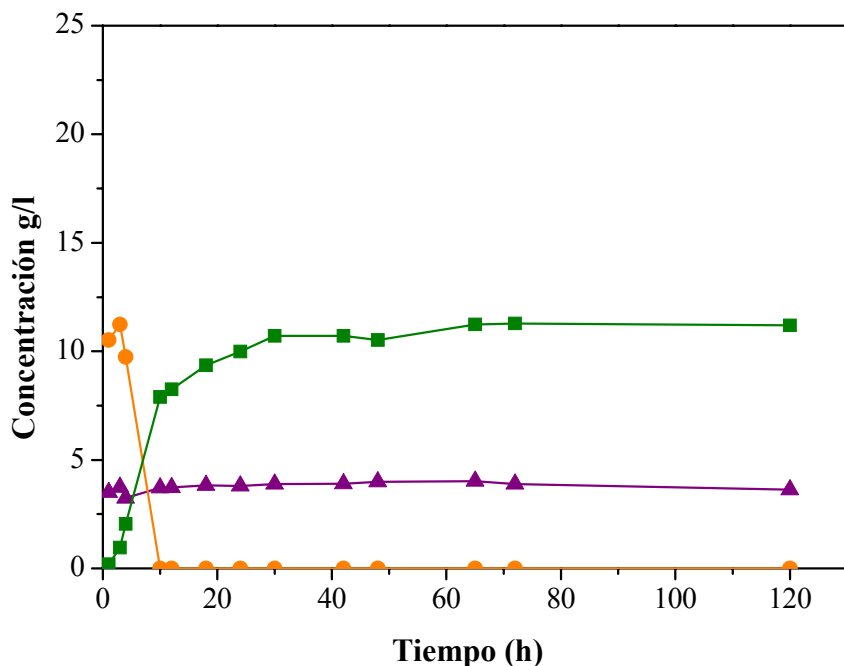


Figura 4.4. Proceso de SFS con *S. cerevisiae* Red Star y carga inicial de sustrato de 10% (p/v) de RSI. Símbolos: (■) etanol; (●) glucosa y (▲) xilosa.

Puesto que la levadura *S. cerevisiae* (más comúnmente utilizada en los procesos industriales de fermentación) tiene una temperatura óptima de fermentación por debajo de la óptima de HE, el uso de levaduras termotolerantes como *K. marxianus* aparece como una alternativa muy interesante para mejorar los rendimientos globales del proceso de SFS. La cepa *K. marxianus* CECT 10875 empleada en la presente Tesis Doctoral fue obtenida en los laboratorios del CIEMAT mediante mutagénesis química y selección (Ballesteros, 2000), y se ha mostrado como una opción muy prometedora en procesos de SFS a partir de diferentes materiales lignocelulósicos (Ballesteros y col., 1998; Ballesteros y col., 2001; Ballesteros y col., 2004). En ese contexto y con el fin de comparar con los resultados obtenidos en SFS a temperaturas más bajas (32 °C), se realizaron ensayos de SFS a 42 °C con *K. marxianus* CECT 10875 con 10% (p/v) de RSI lavado de paja de trigo pretratada (**artículo IV**). Como se comentó anteriormente, el volumen de inóculo y las dosis de enzima fueron de 1 g/l y 15 UPF/g celulosa y 15 UI/g celulosa, respectivamente.

Al realizarse la SFS a 42 °C con *K. marxianus* se obtuvieron 22,2 g/l de etanol con un rendimiento del 0,28 que corresponde a un 58% del teórico. Por el contrario, como se observó en la figura 4.4, en el caso de emplear *S. cerevisiae* Red Star la concentración de etanol máxima fue de 11,2 g/l que suponía aproximadamente un 40% del teórico con un rendimiento del 0,22. Ambos rendimientos en etanol se calcularon teniendo en cuenta la glucosa presente en el material pretratado. El porcentaje del teórico se calculó asumiendo una conversión de celulosa en glucosa durante la HE del 100% y una conversión de glucosa a etanol máxima de 0,51 g/g.

Durante las primeras 24 h de SFS a 32 °C con el RSI se obtuvo el 90% de la producción final de etanol con una productividad volumétrica de 0,42 g/lh. La productividad volumétrica, entendida como los g/l de etanol producidos a las 24 h, fue también mayor al emplear *K. marxianus* debido a la mayor tasa de HE al emplear temperaturas más altas. La productividad volumétrica es un valor a tener en cuenta durante los procesos de producción de etanol, ya que el tiempo necesario para alcanzar altos rendimientos en etanol puede variar de un proceso a otro. Será más rentable económicamente aquel proceso en el que se alcancen mayores concentraciones de

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

etanol en el menor tiempo, es decir, aquel que muestre productividades volumétricas más altas.

Para producir altas concentraciones de etanol son necesarias altas cargas de sustrato iniciales en la SFS que impliquen mayor concentración de azúcares fermentables. Teniendo en cuenta el contenido medio en glucosa de los materiales lignocelulósicos generalmente empleados en los procesos de SFS, serán necesarias cargas de sustrato de entre 14-15% para asegurar concentraciones de etanol cercanas al 4% (p/p), considerada esta concentración como punto de referencia para una destilación económicamente viable (Ballesteros y col., 2004; Wingren y col., 2003). En ese contexto, con el fin de obtener mayores concentraciones de etanol, se realizaron procesos de SFS con *K. marxianus* CECT 10875 y mayores cargas de sustrato.

Los resultados comparativos de los diferentes estudios de SFS con RSI lavado de paja de trigo pretratada por EV al emplear *S. cerevisiae* Red Star y *K. marxianus* CECT 10875 se resumen en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Concentración de etanol, rendimientos y productividades volumétricas en diferentes procesos de SFS con el RSI lavado obtenido tras el pretratamiento de la paja de trigo por EV.

	Artículo I	Artículo IV		
Microorganismo	<i>S. cerevisiae</i> Red Star	<i>K. marxianus</i> CECT 10875		
Temperatura de SFS	32 °C	42 °C		
Carga sustrato	10% (p/v)	10% (p/v)	12% (p/v)	14% (p/v)
Rto <sub>EtOH/G</sub>	0,20	0,28	0,29	0,27
Q <sub>EtOH(24h)</sub>	0,42	0,88	1,14	1,15
Etanol máximo (g/l)	11,2	22,2	27,6	30,2

Como se observa en la tabla 4.4, al emplear *K. marxianus* CECT 10875 se obtuvieron 22,2, 27,6 y 30,2 g/l de etanol con 10, 12 y 14% (p/v) de RSI, respectivamente, con un rendimiento en etanol basado en la glucosa presente en el material pretratado muy similar en todos los casos (0,27-0,29).

La mayor concentración de etanol (30,2 g/l) en un proceso de SFS con el RSI lavado se obtuvo al usar *K. marxianus* CECT 10875 como microorganismo fermentador y un 14% (p/v) de carga inicial de sustrato. Esta concentración de etanol supuso un rendimiento del 54% del teórico basado en la glucosa presente en el material pretratado y asumiendo el rendimiento máximo teórico de conversión de glucosa a etanol (0,51 g/g). No obstante, teniendo en cuenta los rendimientos de etanol para *K. marxianus* CECT 10875 obtenidos de forma experimental (0,45 g/g) en el **artículo IV**, los rendimientos sobre el teórico fueron de 62, 64 y 61%, con 10, 12 y 14% (p/v) de carga de sustrato, respectivamente.

Con el fin de mejorar los rendimientos en etanol del proceso se realizó un ensayo de SFS utilizando *K. marxianus* CECT 10875 en el que el sustrato se añadió mediante pulsos. Los procesos de SFS con adición de sustrato por pulsos (semicontinuo) pueden mejorar los rendimientos de sacarificación, ya que se minimiza la acumulación de la glucosa en el medio reduciendo así la inhibición por producto final (Laopaiboon y col., 2007; Rudolf y col., 2005). Las cargas de sustrato iniciales en la SFS en semicontinuo fueron de 10-12% (p/v). Se añadieron pulsos de 2% o 4% (p/v) de RSI a diferentes tiempos (12, 24 y 40 h) hasta alcanzar los 14% (p/v). Como se puede observar en la figura 4.5, todas las SFS siguieron un perfil similar alcanzándose concentraciones de etanol alrededor de 25 g/l a las 12 h lo que correspondería a productividades volumétricas de etanol de 2 g/lh. Las productividades volumétricas fueron ligeramente superiores cuando se empleó el 12% (p/v) como carga de sustrato inicial. La concentración más alta de etanol (36,2 g/l) correspondió al 73% del teórico asumiendo los rendimientos de etanol obtenidos experimentalmente (0,45 g/g) y se consiguió con una carga inicial de RSI del 10% (p/v) y una única adición de 4% (p/v) a las 12 h de proceso. La mayor concentración de etanol en procesos de SFS con adición de pulsos a tiempos más cortos fue observada previamente por otros autores a partir de materiales lignocelulósicos pretratados por EV (Olofsson, 2008a; Rudolf y col., 2005). Esto puede ser debido a la pérdida de estabilidad celular a lo largo del proceso de SFS debido a que el metabolismo celular sea menos eficiente hacia el final del proceso.

La concentración máxima de 36,2 g/l significó un incremento de un 20% en la producción de etanol en comparación con la SFS convencional con un 14% de RSI (tabla 4.4). Esta concentración se encuentra muy próxima al 4% (p/p) considerado punto

de referencia para una destilación viable económicamente (Ballesteros y col., 2004; Wingren y col., 2003). El rendimiento de etanol teniendo en cuenta la glucosa del material pretratado aumentó de 0,27 a 0,33 en la SFS semicontinua, lo que se tradujo en un aumento del porcentaje del teórico de 61% a 73% (asumiendo el rendimiento de 0,45 g/g).

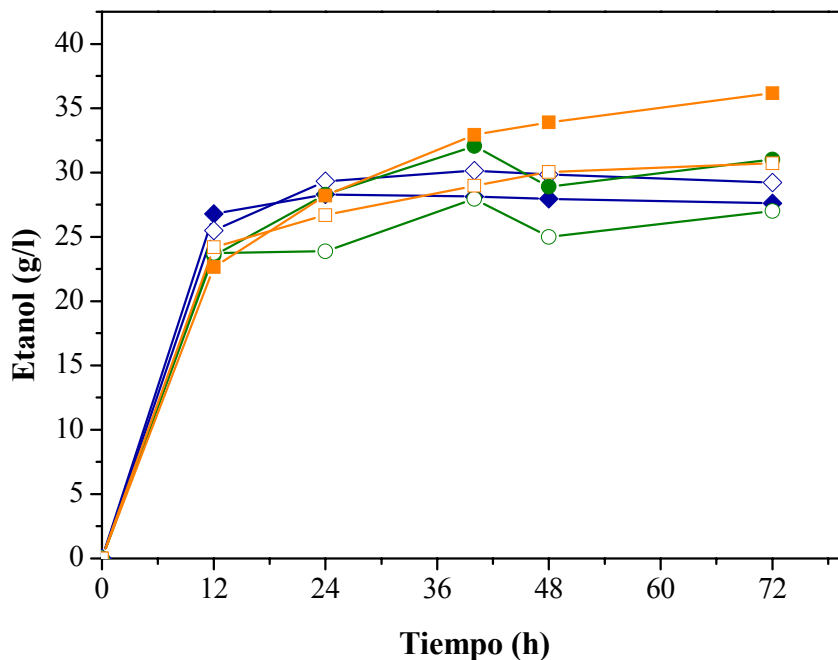


Figura 4.5. Producción de etanol en procesos de SFS con carga inicial de sustrato de 10% y 12% (p/v) de RSI y adición de sustrato por pulsos. Los símbolos para las diferentes configuraciones son los siguientes: (●) 10% + 2%(12h) + 2%(40h); (○) 10% + 2%(24h) + 2%(40h); (■) 10% + 4%(12h); (□) 10% + 4%(24h); (◆) 12% + 2%(12h); y (◇) 12% + 2%(40h).

### 4.3. SACARIFICACIÓN Y COFERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS

Actualmente, las plantas industriales de producción de etanol de primera generación (basadas en biomasa azucarada y amilácea) utilizan exclusivamente *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador ya que presenta rendimientos en etanol cercanos al máximo teórico y alta tolerancia al etanol (Wheals y col., 1999). El mayor inconveniente de usar *S. cerevisiae* en la obtención de etanol a partir de lignocelulosa es su incapacidad de fermentar las pentosas a etanol.

Cuando se emplea la biomasa lignocelulósica como materia prima en los procesos de producción de bioetanol de segunda generación, la utilización completa de todos los azúcares es uno de los requisitos para hacer que el proceso sea competitivo económicamente (Galbe y Zacchi, 2002). Esto significa que todos los azúcares presentes en la celulosa y hemicelulosa deben ser convertidos a etanol y que en el caso de utilizar el MPC, los microorganismos deben realizar dicha conversión de forma eficiente en presencia de los productos tóxicos generados durante el pretratamiento. El empleo de materiales como la paja de trigo, que puede contener hasta un 30% de hemicelulosas (principalmente xilosa) en su composición, hace necesaria una cofermentación eficiente de la xilosa y la glucosa para aumentar la rentabilidad del proceso.

Puesto que las cepas salvajes de *S. cerevisiae* no son capaces de transformar la xilosa presente en los materiales lignocelulósicos a etanol, durante los últimos años se han realizado numerosas investigaciones utilizando la ingeniería genética para obtener levaduras capaces de cofermentar la xilosa y la glucosa de forma eficiente (Hahn-Hägerdal y col., 2007; Van Vleet y Jeffries, 2009). Entre las diferentes estrategias para desarrollar una cepa recombinante de *S. cerevisiae* capaz de cofermentar xilosa y glucosa destacan: 1) la introducción de los genes *XYL1* y *XYL2* que codifican para la xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenada (XDH) de levaduras fermentadoras de xilosa y, 2) la introducción del gen que codifica para la xilosa isomerasa (XI) presente en bacterias y algunos hongos (Jeffries, 2006; Hahn-Hägerdal y col., 2007).

La cepa fermentadora de pentosas empleada en esta Tesis Doctoral es *S. cerevisiae* F12 [*S. cerevisiae* F *HIS3::YIplexZEO XR/XDH/XK*]. *S. cerevisiae* F12 es una cepa industrial modificada genéticamente mediante la introducción de los genes de la XR y XDH de *P. stipitis*. La introducción de ambos genes va acompañada de la sobreexpresión del gen endógeno que codifica para la xilulokinasa (XK). Esta levadura ha sido utilizada previamente para la producción de etanol a partir de residuos del grano de trigo (Olsson y col., 2006) y se ha mostrado altamente tolerante a los productos de degradación generados durante el pretratamiento de paja de trigo (Panagiotou y Olsson, 2007).

##### 4.3.1. Cofermentación de la glucosa y la xilosa en los prehidrolizados

La configuración más empleada hasta el momento en el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa consiste en la separación de la fracción líquida y sólida del material pretratado seguida de una HFS o SFS del RSI lavado (Palmqvist y col., 1996). En este caso, la fracción líquida o prehidrolizado, que contiene la mayor parte de los azúcares hemicelulósicos, podría ser fermentada por microorganismos fermentadores de xilosa. Debido a que los productos tóxicos generados en el pretratamiento también se encuentran solubilizados en el prehidrolizado sería necesario el empleo de levaduras que presenten una elevada tolerancia a los inhibidores.

En el **artículo I** se realizó la fermentación del prehidrolizado obtenido tras la filtración de la paja de trigo pretratada por EV a 210 °C durante 5 min con *S. cerevisiae* F12. El prehidrolizado fue diluido hasta un 10% (p/v) de sólidos insolubles, con una concentración inicial de glucosa y xilosa de 4,2 g/l y 18,3 g/l, respectivamente. Los azúcares presentes en la fracción líquida se encontraron mayoritariamente en forma de oligómeros, por lo que fue necesario un paso previo de post-hidrólisis ácida (4% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 120 °C y 30 min) para obtener los azúcares en su forma monomérica y hacerlos así disponibles para el microorganismo. En la figura 4.6 está representado el consumo de azúcares y la producción de etanol durante 50 h de fermentación del prehidrolizado a 32 °C, pH 5,0 y con 1 g/l de volumen de inóculo. Como se observa en la figura, la glucosa presente en el medio (4,2 g/l) fue consumida en su totalidad durante las primeras 18-20 h de proceso. Sin embargo, todavía quedaban en el medio 13,6 g/l de xilosa residual tras 50 h de fermentación. Cabe mencionar, que los productos tóxicos presentes en el medio de fermentación (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico...) afectan al metabolismo de las levaduras de manera significativa reduciendo la tasa de consumo de los azúcares (Taherzadeh y col., 2000b). A pesar de que la concentración de inhibidores retrasa el consumo de azúcares y el crecimiento, al emplear *S. cerevisiae* F12 el rendimiento de etanol sobre los azúcares consumidos fue de 0,37 g/g que puede considerarse relativamente alto. Rendimientos similares fueron obtenidos por la cepa recombinante *S. cerevisiae* 424A al fermentar diferentes prehidrolizados lignocelulósicos (Sedlack y Ho, 2004). No obstante, aunque la glucosa

fue consumida en su totalidad, la baja asimilación de xilosa (sólo se consumieron aproximadamente 5 g/l) resultó en una concentración de etanol de 3,3 g/l.

El análisis de los inhibidores presentes en el medio tras la fermentación mostró que el furfural y el HMF fueron completamente metabolizados por la levadura y no se detectaron tras 50 h de fermentación. La completa asimilación de estos aldehídos, que provoca una prolongación de la fase de latencia es necesaria para que comience la producción de etanol (Almeida y col., 2007; Liu y col., 2004). Tras la fermentación no se observó disminución en la concentración del resto de compuestos tóxicos.

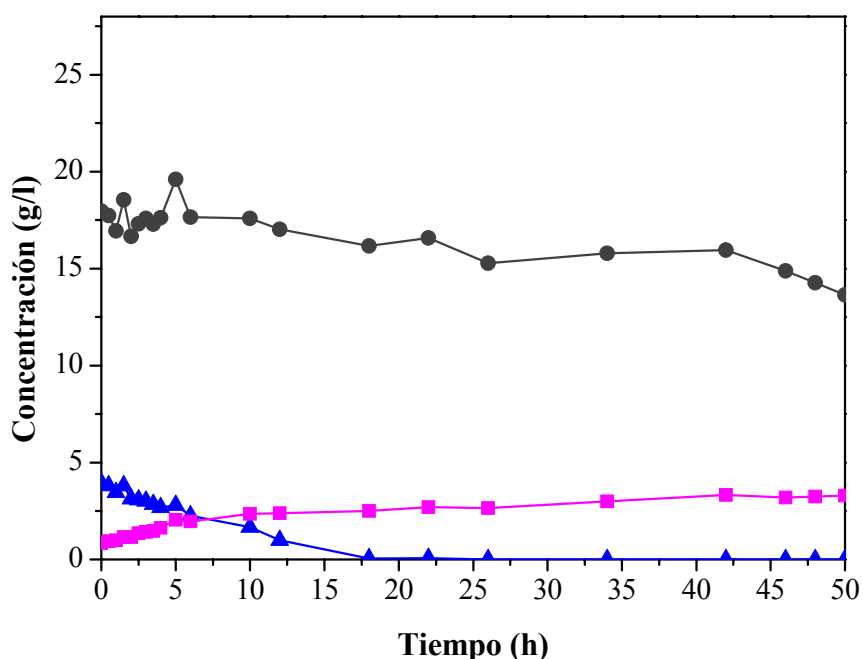


Figura 4.6. Fermentación del prehidrolizado (correspondiente a un material pretratado completo con un 10% p/v de RSI) obtenido a partir de paja de trigo pretratada por explosión por vapor con *S. cerevisiae* F12. Símbolos: (■) etanol; (▲) glucosa y (●) xilosa.

Cabe destacar, que cuando las levaduras fermentadoras de pentosas crecen en condiciones limitantes de oxígeno, el crecimiento es más lento, la tasa de producción de etanol disminuye y se suele observar un aumento en la producción de xilitol. La producción de xilitol supone una de las limitaciones más importante en las levaduras que contienen los genes *XYL1* y *XYL2* que codifican para la XR y XDH, respectivamente. Uno de los principales problemas se atribuye al hecho de que la XR de

*P. stipitis* puede emplear NADPH y NADH como cofactores mientras que la XDH usa exclusivamente  $\text{NAD}^+$  (Olsson y Nielsen, 2000). Las diferentes preferencias por los cofactores resultan en un desequilibrio del balance redox de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Aristidou y Penttila, 2000). Así pues, mediante la excreción de xilitol se regenera el  $\text{NAD}^+$ , ya que el NADH no puede ser suficientemente reoxidado a  $\text{NAD}^+$  bajo condiciones limitantes de oxígeno (Meinander y col., 1999).

Puesto que la producción de xilitol supone una disminución del rendimiento de producción de etanol a partir de la xilosa, cabe destacar que durante la fermentación del prehidrolizado no se observó producción de xilitol. El descenso en la producción de xilitol en fermentaciones de prehidrolizados lignocelulósicos puede deberse a la presencia de algunas sustancias como las cetonas o aldehídos que actúan como aceptores externos de electrones. Este hecho conlleva una reducción de la formación de xilitol aportando el  $\text{NAD}^+$  necesario para la reacción de la XDH y redirigiendo la formación de producto hacia el etanol (Karhumaa y col., 2007; Wahlbom y Hahn-Hägerdal, 2002). *S. cerevisiae* reduce el furfural y el HMF a alcohol furfurílico y alcohol 5-hidroximetilfurfurílico, respectivamente (Taherzadeh y col., 2000b). Durante la reducción del furfural el NADH es oxidado a  $\text{NAD}^+$  y este aporte de  $\text{NAD}^+$ , que está disponible para la XDH, dirige la reacción hacia la producción de etanol a expensas de la formación de xilitol (Wahlbom y Hahn-Hägerdal, 2002). Por consiguiente, la presencia de furfural en los prehidrolizados puede contribuir a aumentar el rendimiento en etanol a partir de la xilosa. La reducción del HMF no afecta la formación de xilitol ya que necesita NADPH en lugar de NADH como cofactor.

#### **4.3.2. Procesos de SCFS a partir del RSI**

Aunque la mayor parte de la hemicelulosa se solubiliza durante el pretratamiento de EV, en el RSI siempre permanece una fracción residual de hemicelulosa que es liberada durante la etapa de HE por la acción de las celulasas (García-Aparicio y col., 2006; Sørensen y col., 2005). Por ello, durante la SFS del RSI también se libera xilosa procedente de la fracción hemicelulósica que puede ser transformada a etanol en un proceso de sacarificación y cofermentación simultánea (SCFS) si se utiliza una levadura

fermentadora de pentosas. En la figura 4.7 se representa un proceso de SCFS con *S. cerevisiae* F12 a partir del RSI lavado (**artículo I**). Las condiciones fueron las mismas que en el proceso de SFS con *S. cerevisiae* Red Star es decir, una carga de RSI al 10% (p/v), una dosis de celulasas de 15 UPF/g de celulosa y 15 UI/g celulosa de  $\beta$ -glucosidasa y un volumen de inóculo de 1 g/l. La SCFS fue llevada a cabo a 32 °C y pH 5,0 durante 120 h.

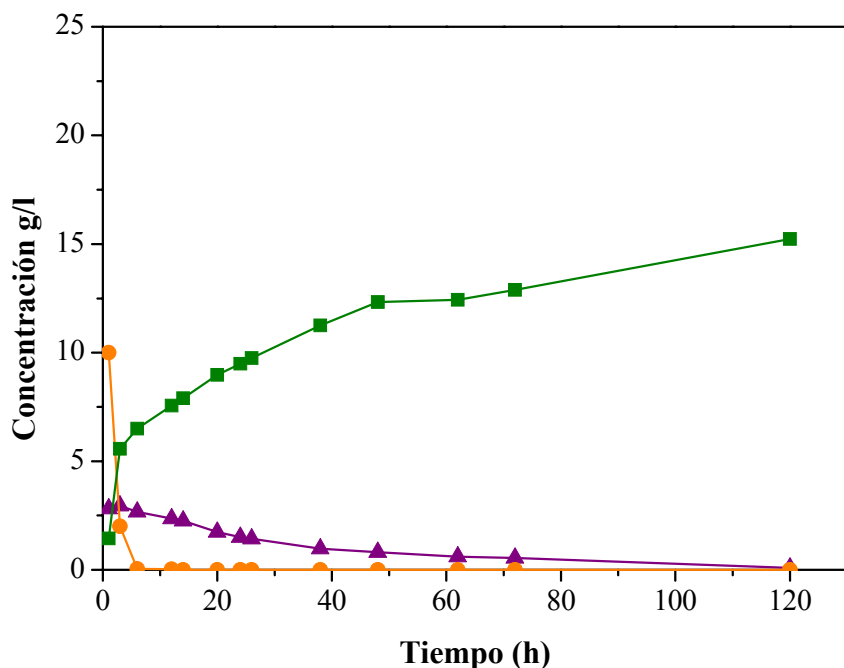


Figura 4.7. Proceso de SCFS con *S. cerevisiae* F12 y carga inicial de sustrato de 10% (p/v) de RSI lavado. Símbolos: (■) etanol; (●) glucosa y (▲) xilosa.

El proceso de SCFS fue precedido también por una etapa previa de presacarificación de 8 h, por lo que parte de la glucosa y la xilosa se encontraba solubilizada en el momento de la inoculación del medio con las levaduras. La glucosa fue rápidamente consumida por *S. cerevisiae* F12 durante las primeras 8 h de proceso y la xilosa liberada por la acción del complejo enzimático fue consumida prácticamente en su totalidad no detectándose en el medio a las 120 h, coincidiendo con la máxima concentración de etanol (15,2 g/l). Así pues, utilizando la levadura fermentadora de pentosas *S. cerevisiae* F12 se obtuvo un 25% más de etanol que con *S. cerevisiae* Red Star en las mismas condiciones de proceso. Como será comentado a continuación, el aumento en la producción de etanol (de 11,2 a 15,2 g/l) no se debe exclusivamente al

mayor consumo de xilosa libre (aproximadamente 4 g/l) (figuras 4.4 y 4.7). La diferencia en la concentración de etanol está relacionada también con el aumento del rendimiento en HE debido al continuo consumo de xilosa, ya que ésta ejerce un efecto inhibitorio sobre las celulasas (Xiao y col., 2004).

### **4.3.3. Procesos de SFS y SCFS a partir del material pretratado completo**

Uno de los puntos clave para la integración de proceso en la producción de etanol vía enzimática es la utilización en la SFS del material pretratado completo (MPC) y no sólo el RSI. Al emplear el MPC se evitan pérdidas de azúcares potencialmente fermentables, se minimizan los volúmenes de agua empleados y se reducen los costes de proceso al evitar el paso de filtración (Palmqvist y col., 1997). La utilización del MPC a alta carga de sólidos es uno de los requisitos para hacer los procesos de producción de etanol a partir de biomasa económicamente rentables (Galbe y Zacchi, 2002). Sin embargo, al emplear el MPC hay que tener en cuenta que una mayor concentración de sólidos iniciales implica también mayor concentración de tóxicos en el medio de fermentación, lo que supone una limitación importante.

En la figura 4.8 se muestran los procesos de SFS y SCFS realizados con el MPC obtenido tras la EV de la paja de trigo a 210 °C durante 5 min (**artículo I**). Ambos procesos se llevaron a cabo con una carga inicial de MPC con un 10% (p/v) de sólidos insolubles. En el proceso de SFS se empleó *S. cerevisiae* Red Star que no posee la capacidad de fermentar la xilosa. En el proceso de SCFS se utilizó *S. cerevisiae* F12 modificada por ingeniería genética para la utilización de la xilosa. Ambos experimentos se realizaron durante 120 h a las mismas condiciones que cuando se empleó el RSI lavado como sustrato es decir, 32 °C, pH 5,0, 1 g/l de inóculo, 15 UPF/g de celulosa de Celluclast 1.5 L FG y 15 UI/g celulosa de  $\beta$ -glucosidasa NS50010.

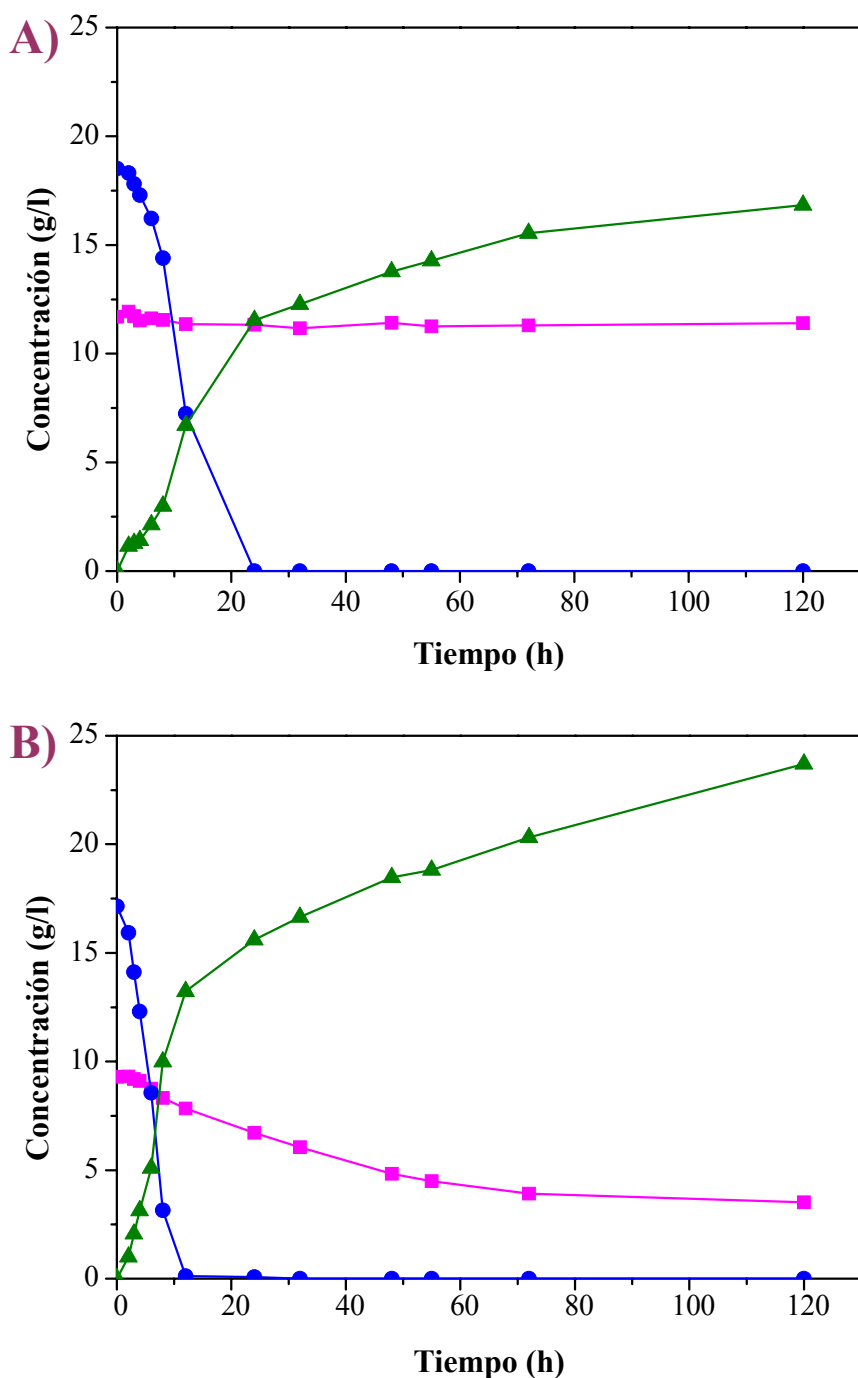


Figura 4.8. (A) Proceso de SFS con la cepa *S. cerevisiae* Red Star. (B) Proceso de SCFS con la cepa *S. cerevisiae* F12. Ambos experimentos se llevaron a cabo con el MPC correspondiente a 10% (p/v) de sólidos insolubles. Símbolos: (●) glucosa, (■) xilosa y (▲) etanol.

Como se observa en ambos casos, la concentración de glucosa en el medio fue de 17 g/l tras 8 h de presacarificación. La glucosa fue rápidamente consumida tras la

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

inoculación. El consumo de glucosa fue más rápido al emplear *S. cerevisiae* F12 y tras 12 h no se detectó glucosa en el medio. En cambio, *S. cerevisiae* Red Star tardó 24 h en consumir la glucosa libre en su totalidad. Esa mayor tasa de consumo de glucosa por parte de *S. cerevisiae* F12, además de la capacidad de fermentar xilosa se tradujo en una mayor productividad volumétrica de etanol (0,5 g/lh y 1,1 g/lh para *S. cerevisiae* Red Star y *S. cerevisiae* F12, respectivamente) a las 12 h de proceso.

Como se muestra en la gráfica 4.8, al emplear *S. cerevisiae* Red Star la concentración de xilosa permaneció constante durante todo el proceso, siendo de 11,4 g/l a las 120 h. La glucosa y la xilosa fueron cofermentadas por *S. cerevisiae* F12 alcanzando una concentración final de etanol de 23,7 g/l lo que supuso un 30% más de producción de etanol. La diferencia en la concentración final de xilosa observada (aproximadamente 8 g/l), al igual que ocurrió al emplear el RSI lavado, no explicaría la diferencia en etanol de 7 g/l entre el proceso de SFS y SCFS. Es decir, la eliminación continua de la xilosa del medio durante la SCFS implicaría un aumento de los rendimientos en hidrólisis enzimática tanto en xilosa como en glucosa ya que se reduce la inhibición de producto final que ejerce la xilosa sobre las enzimas. La inhibición por producto final de los azúcares hemicelulósicos sobre las celulasas fue demostrada previamente en procesos de HE de maderas blandas (Xiao y col., 2004). No obstante, los mecanismos de inhibición de los azúcares hemicelulósicos sobre las celulasas no están todavía aclarados.

Al emplear el MPC en el proceso de SCFS además de alcanzarse un 30% más de etanol que en la SFS se obtuvo una mayor concentración de etanol que al realizar la fermentación del prehidrolizado (3,3 g/l) y la SCFS del RSI (15,2 g/l) por separado. Es decir, al emplear la levadura fermentadora de pentosas *S. cerevisiae* F12 es más interesante utilizar el MPC, no sólo por evitar el paso de filtración, con el ahorro económico que ello supone, sino porque se obtienen mayores rendimientos de etanol que al fermentar las dos fracciones por separado.

### **4.4. COMPARACIÓN DEL PROCESO DE HFS Y SFS/SCFS**

Con el fin de comparar el proceso de hidrólisis y fermentación por separado (HFS) con la sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y la sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS) se llevaron a cabo hidrólisis enzimáticas del RSI y del MPC. La concentración de etanol en los procesos de HFS se estimó realizando los experimentos de HE a las mismas condiciones que las SFS/SCFS, es decir, la carga enzimática fue de 15 UPF/g de celulosa de Celluclast 1.5 L FG y 15 UI/g celulosa de  $\beta$ -glucosidasa (NS50010). Se realizó una presacarificación de 8 h a 50 °C tras la que se redujo la temperatura a 32 °C para realizar la hidrólisis durante 120 h. Un vez determinadas la glucosa y xilosa liberadas durante la HE se estimó la concentración de etanol asumiendo los rendimientos a partir de la glucosa y xilosa (0,46 g/g y 0,26 g/g, respectivamente) obtenidos experimentalmente por Sonderegger y col. (2004) para la levadura recombinante *S. cerevisiae* F12.

Como se observa en la figura 4.9 durante la prehidrólisis se liberaron 4,4 g/l de xilosa y 12,8 g/l de glucosa cuando se empleó el RSI como sustrato. Con el MPC tras las 8 h de prehidrólisis se detectaron en el medio 13,6 g/l y 20,1 g/l de xilosa y glucosa, respectivamente. Al emplear el MPC, cabe esperar mayores concentraciones de azúcares tras la prehidrólisis debido a que también están presentes los azúcares solubilizados durante el pretratamiento (4,2 g/l glucosa y 18,3 g/l xilosa).

Las concentraciones finales de glucosa y xilosa tras 120 h de HE del RSI fueron de 23,9 g/l y 6,6 g/l, respectivamente. En el caso del MPC, las concentraciones fueron de 37,5 g/l y 20,7 g/l. Como se comentó en apartados anteriores, la solución enzimática comercial Celluclast 1.5 L FG presenta básicamente actividad celulasa aunque también produce una hidrólisis parcial de la fracción hemicelulósica del RSI (García-Aparicio y col., 2006; Sørensen y col., 2005). Las concentraciones de glucosa y xilosa producidas en la HE se utilizaron para calcular los rendimientos de etanol sobre azúcares consumidos durante la SFS/SCFS. Cabe destacar que estos rendimientos podrían estar sobrestimados debido a que durante la SFS/SCFS los rendimientos de HE son mayores, ya que el continuo consumo de los azúcares por el microorganismo minimiza la

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

inhibición por producto final sobre las celulasas. El rendimiento en glucosa durante la HE fue aproximadamente de 42% y 58% al emplear el RSI y el MPC, respectivamente.

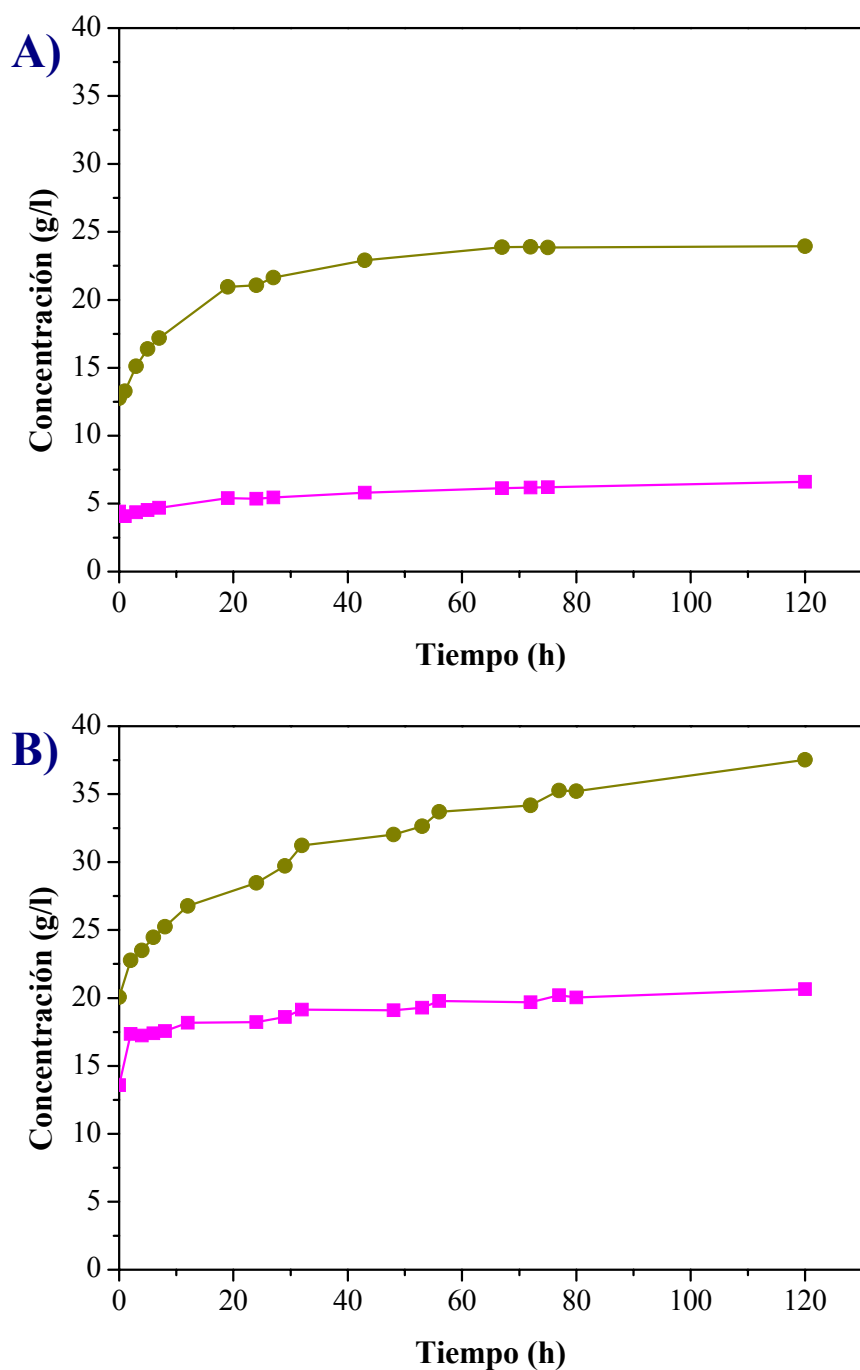


Figura 4.9. Glucosa (●) y xilosa (■) liberada durante procesos de HE con (A) residuo sólido insoluble (10% p/v) (B) material pretratado completo (con 10% p/v de sólidos insolubles). Dosis enzimática: 15 UPF/g celulosa y 15 UI/ g celulosa.

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Aunque debido a la presencia de productos tóxicos y a la mayor concentración de azúcares solubles los rendimientos en HE suelen ser superiores sobre el RSI que sobre el MPC, en estos ensayos se obtuvieron mayores rendimientos de sacarificación con el MPC. Esto puede deberse a que la fracción del RSI fue sometida a un proceso previo de secado durante 90 h que puede dar lugar a una alteración de la estructura de los poros del material, disminuyendo la susceptibilidad al ataque enzimático y reduciendo así los rendimientos en HE (Esteghlalian y col., 2001; Hendriks y Zeeman, 2009).

La tabla 4.5 muestra la glucosa y xilosa solubilizadas durante la HE, la estimación de la concentración de etanol que podría obtenerse en un proceso de HFS y la concentración de etanol obtenida experimentalmente en los procesos de SFS y SCFS.

**Tabla 4.5. Concentración de etanol obtenida en los procesos de SFS y SCFS y valores teóricos calculados para un proceso de HFS.**

	SCFS <i>S. cerevisiae</i> F12		SFS <i>S. cerevisiae</i> Red Star	
	RSI	MPC	RSI	MPC
Glucosa disponible tras HE (g/l)	23,9	37,5	23,9	37,5
Xilosa disponible tras HE (g/l)	6,6	20,7	-	-
Concentración de etanol obtenida en el proceso SFS/SCFS (g/l)	15,2	23,7	11,2	16,8
Concentración de etanol teórica en un proceso de HFS (g/l)*	12,7	22,6	11,0	17,2

\* Calculados en base a los azúcares liberados durante la HE y asumiendo los rendimientos de etanol a partir de la glucosa y xilosa obtenidos experimentalmente para *S. cerevisiae* F12 [0,46 g/g y 0.26 g/g, respectivamente (Sonderegger y col., 2004)].

Para estimar la concentración de etanol producida en el proceso de HFS con *S. cerevisiae* Red Star se asumió el rendimiento de etanol a partir de la glucosa para *S. cerevisiae* F12 de 0,46 g/g (Sonderegger y col., 2004). Como se indica en la tabla 4.5, no hay grandes diferencias en la producción de etanol a partir del RSI lavado o el MPC entre el proceso de HFS y SFS con *S. cerevisiae* Red Star.

Como se ha comentado con anterioridad, el RSI utilizado en estos experimentos se secó a 50 °C durante 90 h. Esto ha podido afectar los rendimientos de HE reduciendo

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

la liberación de glucosa. Un rendimiento mayor de HE con el RSI húmedo implicaría una mayor liberación de azúcares en el medio y por consiguiente una mayor inhibición por producto final. En este caso, se observarían diferencias mayores en la producción de etanol al comparar la HFS con la SFS y SCFS.

Al emplear *S. cerevisiae* F12 en un proceso de SCFS, se obtuvo un incremento de etanol del 16,4% y 4,6% con el RSI y el MPC, respectivamente. La mejora en la producción de etanol con *S. cerevisiae* F12 en un proceso de SCFS en comparación con la HFS fue observada previamente con residuos de grano de trigo (Olsson y col., 2006). Este aumento en la producción de etanol podría deberse a que, puesto que la xilosa también produce inhibición por producto final sobre las celulasas, un consumo continuo de la misma favorecería la HE. Además, experimentos previos de cofermentación de glucosa y xilosa con *S. cerevisiae* demostraron que concentraciones bajas de glucosa en el medio estimulaban el consumo de xilosa (Öhgren y col., 2006b; Souto-Maior y col., 2009). Esto podría ser debido a que la presencia de glucosa promueve la síntesis de mayor número de enzimas glicolíticas lo que favorece el consumo y fermentación de la xilosa (Meinander y Hahn-Hägerdal, 1997). Es decir, en un proceso de SCFS en el que la concentración de glucosa se mantiene en niveles bajos, se estimula la fermentación de la xilosa sin inhibir el transporte de la misma (Margeot y col., 2009).

En todos los casos, la SFS o la SCFS implican mayor productividad volumétrica debido a que la máxima concentración de etanol se alcanza antes. Resultados similares se obtuvieron al comparar procesos de HFS y SFS a partir de paja de trigo y madera de álamo, ambas pretratadas por EV, en los que los procesos de SFS siempre dieron lugar a mayores productividades volumétricas de etanol (Alfani y col., 2000; Cantarella y col., 2004). Así pues, los procesos de SFS/SCFS deben ser considerados como la mejor opción ya que permiten obtener mayores rendimientos globales, reducen el tiempo total de proceso y facilitan una mayor integración de todas las etapas de proceso.

### **4.5. OBTENCIÓN DE UNA LEVADURA CON ELEVADA TOLERANCIA A LOS TÓXICOS Y EFICIENTE CONSUMO DE XILOSA**

Si se dispone de levaduras fermentadoras de xilosa, una de las configuraciones con una mayor integración de todas las etapas de proceso consiste en emplear el MPC en una SCFS. En ese caso, los productos de degradación originados en el pretratamiento solubilizados en la fracción líquida o prehidrolizado que están presentes en el medio de fermentación, además de afectar el crecimiento celular, pueden reducir el consumo tanto de glucosa como de xilosa, disminuyéndose así la tasa de fermentación y la concentración final de etanol (Almeida y Hahn-Hägerdal, 2009; Panagiotou y Olsson, 2007).

Con el fin de aumentar la tolerancia a los tóxicos y mejorar el consumo de xilosa de las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* se han seguido diversas estrategias (Almeida y Hahn-Hägerdal, 2009; Martin y col., 2007). Entre ellas destacan la ingeniería genética, la mutagénesis y los métodos de selección natural como la ingeniería evolutiva (Matsushika y col., 2009; Wahlbom y col., 2003). Ésta última consiste en adaptar el microorganismo a una determinada presión de selección para conseguir un fenotipo deseado sin necesidad de conocer el gen relacionado con cada función (Çakar y col., 2005; Chatterjee y Yuan, 2006). La ingeniería evolutiva se basa en la posibilidad de seleccionar células con propiedades ventajosas bajo condiciones que reflejen las características de un proceso industrial, por ejemplo, diferentes fuentes de carbono o la presencia de productos inhibidores. En ese contexto, se han realizado diferentes estrategias de ingeniería evolutiva con cepas recombinantes de *S. cerevisiae* para conseguir una eficiente fermentación de la xilosa (Sonderregger y Sauer, 2003; Wouter Wisselink y col., 2009). Además, la adaptación mediante ingeniería evolutiva se muestra como una alternativa prometedora para obtener microorganismos más tolerantes a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Liu y col., 2005; Martin y col., 2007).

Con objeto de obtener una cepa de *S. cerevisiae* con mayor tolerancia a los productos tóxicos y más eficiente en el consumo de xilosa, se sometió a la cepa F12 a un proceso de adaptación mediante evolución (**artículo V**). La adaptación se desarrolló

## 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

cultivando las células en medio líquido con prehidrolizados cada vez más concentrados, es decir, en concentraciones crecientes de los productos de degradación como se esquematiza en la figura 4.10. Cuando los microorganismos se crecen en medio líquido, las células más adaptadas a crecer en un determinado entorno evolucionan a lo largo del tiempo y terminan desplazando a la población original como consecuencia de la adaptación por selección (Sauer, 2001).

El prehidrolizado empleado para la adaptación de la levadura se obtuvo tras la filtración de la paja de trigo pretratada con explosión por vapor a 210 °C durante 5 min. Este prehidrolizado correspondía a un MPC con un 15,2% (p/p) de sólidos insolubles y fue diluido con agua destilada hasta 5, 6, 7, 8 y 9% (p/p) para realizar la adaptación. El proceso empezó creciendo el microorganismo en un matraz con prehidrolizado diluido a 5%. Cada cultivo se creció a 32 °C y pH 5,0 durante 48 h. Para que la concentración de azúcares fuera la misma en todas las diluciones de prehidrolizado se añadió la glucosa y xilosa correspondientes en cada caso, hasta alcanzar la concentración de azúcares del prehidrolizado sin diluir (15,6 g/l y 3,6 g/l de xilosa y glucosa, respectivamente).

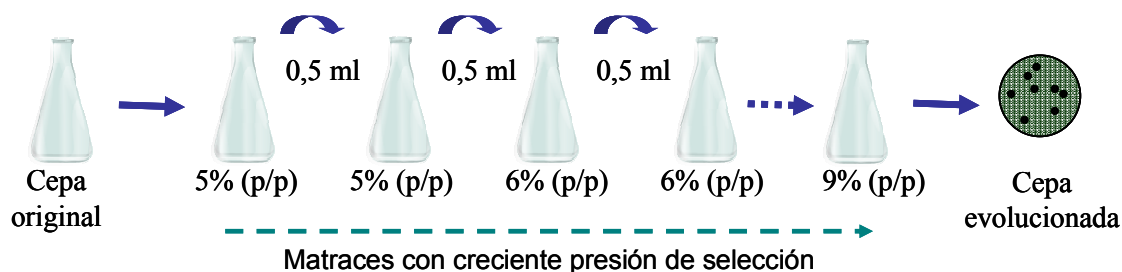


Figura 4.10. Esquema de la estrategia de ingeniería evolutiva realizada en el presente trabajo.

### 4.5.1. Pruebas de fermentabilidad de los prehidrolizados

Con objeto de comprobar la eficacia que el proceso de ingeniería evolutiva tiene en la obtención de levaduras con mayor tolerancia a los tóxicos y mejor producción de etanol a partir de xilosa, se realizaron diferentes pruebas de fermentabilidad con prehidrolizados de paja de trigo (**artículo V**). Los prehidrolizados se obtuvieron tras pretratar la paja de trigo a 200 °C y 210 °C durante 5 min y las composiciones de los mismos se muestran en la tabla 4.2 (apartado 4.1.1.). Como se puede observar la

concentración de los productos tóxicos fue superior al pretratar a 210 °C, ya que un aumento en la temperatura promueve una mayor concentración de estos compuestos.

Los prehidrolizados obtenidos a 200 °C y 210 °C correspondían a MPCs con 16,6% y 15,2% (p/p) de sólidos insolubles, respectivamente. Ambos prehidrolizados se diluyeron hasta concentraciones con 4, 6 y 8% (p/p). La concentración de xilosa y glucosa se fijó en 40 g/l y 10 g/l respectivamente, en todos los casos. Las fermentaciones se realizaron en matraces durante 140 h en un agitador orbital a 150 r.p.m., 32 °C, pH 5,0 y un inóculo de 1 g/l. La cepa original y la adaptada fueron comparadas respecto al consumo de azúcares y a la producción de etanol.

La figura 4.11 muestra el consumo de glucosa en las fermentaciones de ambos prehidrolizados con la cepa original y la adaptada. Se observa que, cuando se utilizaron prehidrolizados equivalentes a MPC con 4% y 6% de sólidos insolubles, no hubo diferencias significativas en el consumo de glucosa y ésta se agotó durante las primeras 12 h de proceso en todos los casos.

Al emplear prehidrolizados al 8% se observaron mayores diferencias entre la cepa adaptada y la parental. En ese caso, al emplear el prehidrolizado obtenido a 200 °C durante 5 min (con menor concentración de tóxicos), la cepa original consumió la glucosa completamente tras 40 h, mientras que la cepa adaptada lo hizo tras 12 h (figura 4.11.A). A la misma dilución (8%) el consumo de glucosa fue mucho más lento cuando se empleó el prehidrolizado obtenido a 210 °C. En este caso (figura 4.11.B), la glucosa fue consumida completamente por la cepa adaptada tras 48 h de fermentación, mientras que a ese tiempo la concentración de glucosa fue de aproximadamente 2 g/l al emplear la cepa original. En ningún caso detectó glucosa residual a las 140 h de proceso. Estos resultados demuestran que pese al efecto negativo que los productos de degradación tienen sobre el consumo de azúcares, el empleo de cepas adaptadas con mayor tolerancia a los inhibidores, supone una tasa mayor de asimilación de la glucosa. Resultados similares se obtuvieron en fermentaciones con hidrolizados de bagazo de caña de azúcar en los que la presencia de compuestos fenólicos, furaldehídos y ácidos alifáticos producían un retraso en el consumo de glucosa (Martin y col., 2007). En el mismo estudio, al igual que ocurre en este caso con prehidrolizados de paja de trigo, la

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

adaptación de *S. cerevisiae* a los compuestos inhibidores presentes en el prehidrolizado se tradujo en un consumo de glucosa más rápido.

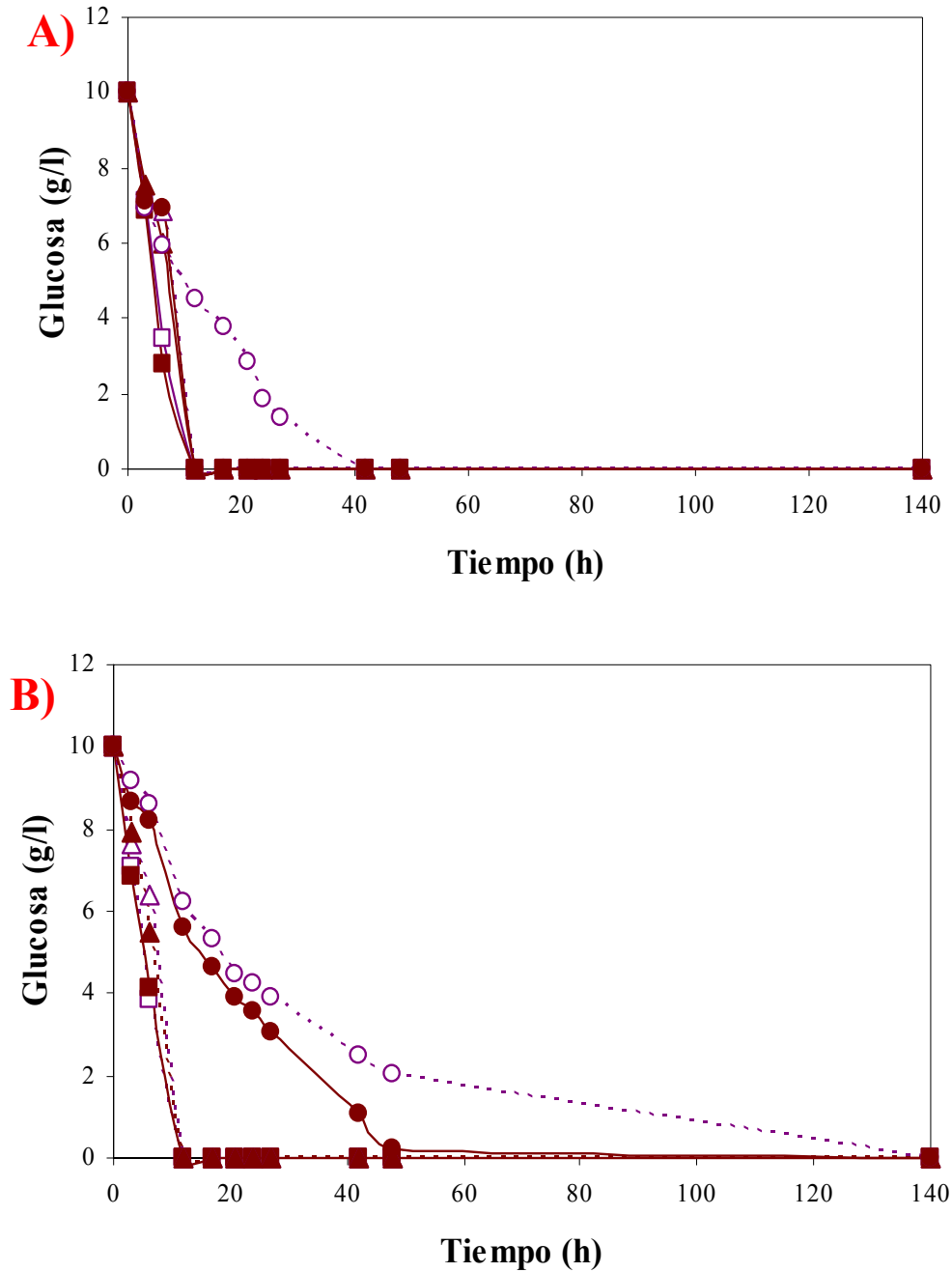
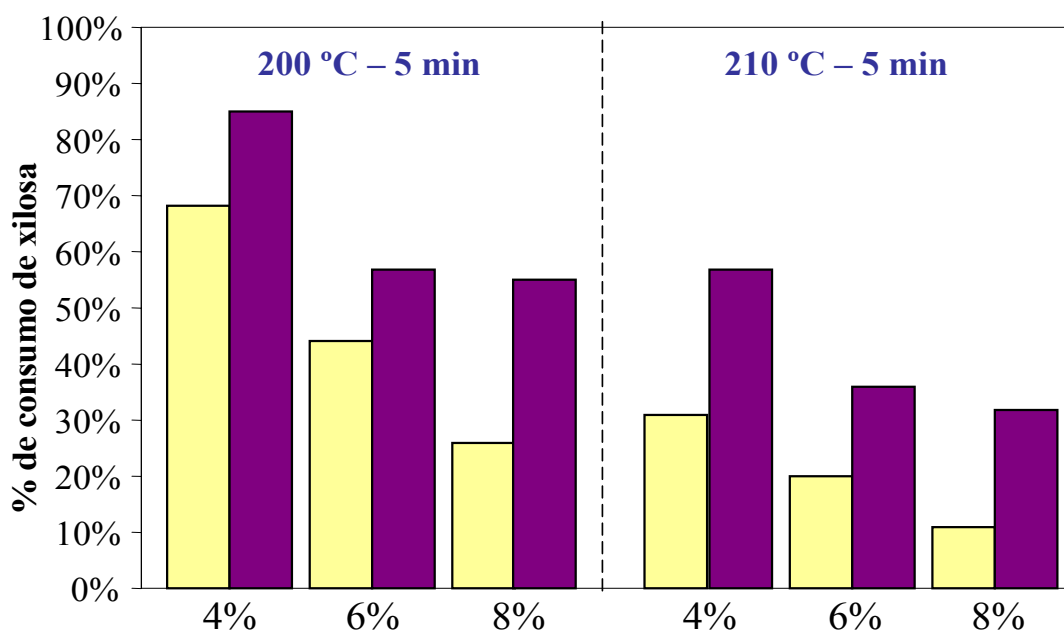


Figura 4.11. Consumo de glucosa durante 140 h de fermentación con prehidrolizados diluidos obtenidos a (A) 200 °C y (B) 210 °C durante 5 min. Las diferentes diluciones de los prehidrolizados se representan con (■) 4% (p/p); (▲) 6% (p/p) y (●) 8% (p/p) de RSI en el MPC. Las líneas discontinuas con símbolos abiertos representan la cepa original. Las líneas continuas con los símbolos cerrados representan la cepa adaptada.

Durante las fermentaciones de los prehidrolizados se evaluó también la capacidad de las levaduras de consumir la xilosa. En la figura 4.12 se representa este consumo de xilosa a las 140 h expresado como porcentaje del total de xilosa presente en el medio (40 g/l). Como se observa en la gráfica, la cepa adaptada mostró mayor consumo de xilosa en todos los casos.

Como se ha comentado, no se detectaron grandes diferencias en el consumo de glucosa a concentraciones de prehidrolizado de 4% y 6% entre la cepa original y la adaptada (figura 4.11). Sin embargo, a estas concentraciones de prehidrolizado sí se observó un consumo de xilosa más eficiente por parte de la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12 (figura 4.12).



**Figura 4.12.** Consumo de xilosa tras 140 h de fermentación de prehidrolizados obtenidos a 200 °C – 210 °C durante 5 min y diluidos hasta concentraciones que corresponderían a MPCs con 4%, 6% y 8% (p/p) sólidos insolubles. Las barras violetas indican la cepa evolucionada y las barras amarillas la cepa original.

El mayor consumo de xilosa (85% de la xilosa potencial) se obtuvo al emplear la cepa adaptada con el prehidrolizado con menor concentración de productos tóxicos (200 °C- 5 min) y diluido hasta 4% (p/p). Es destacable que la mayor diferencia en el consumo de xilosa entre la cepa original y la adaptada se observó al emplear los

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

prehidrolizados más concentrados (8% p/p), siendo el incremento del 53% y 67% en el prehidrolizado obtenido a 200 °C y 210 °C, respectivamente. Estos resultados demostraron el éxito de aplicar la ingeniería evolutiva para conseguir microorganismos que utilicen más eficientemente la xilosa.

La tabla 4.6 muestra la concentración final de etanol, la productividad volumétrica, los rendimientos y la formación de subproductos en cada una de las pruebas de fermentabilidad. Como se observa en la tabla, el mayor consumo de xilosa de la cepa adaptada se tradujo en mayores concentraciones finales de etanol como había sido previamente observado por Sonderegger y Sauer (2003). El consumo más rápido de la misma por parte de la cepa adaptada, se vio reflejado en mayores productividades volumétricas. La mayor concentración de etanol (13,1 g/l) se obtuvo con la cepa adaptada y el prehidrolizado con menor cantidad de inhibidores (200 °C, 5 min y diluido al 4%), coincidiendo también con el mayor consumo de xilosa (85%). Incluso al emplear los prehidrolizados más concentrados (8% p/p) la cepa adaptada mostró incrementos en la concentración final de etanol de 45% y 20% con el prehidrolizado obtenido a 200 °C y 210 °C, respectivamente. No obstante, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los rendimientos de etanol sobre azúcares consumidos, el empleo de la cepa adaptada sí mejoraría los rendimientos respecto a los azúcares totales. Por ejemplo, el rendimiento en etanol teniendo en cuenta la glucosa y la xilosa totales (10 g/l y 40 g/l, respectivamente) aumentaría de 0,22 a 0,26 y de 0,16 a 0,24 al emplear los prehidrolizados (diluidos al 4% p/p) obtenidos a 200 °C y 210 °C, respectivamente.

En todos los casos, el consumo y fermentación más eficiente de la glucosa y la xilosa por parte de la cepa adaptada dio lugar a productividades volumétricas más altas por lo que, como ha sido comentado con anterioridad, es beneficioso desde un punto de vista económico adaptar la cepa ya que daría lugar a una reducción del tiempo total de proceso.

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Tabla 4.6. Producción, rendimientos, productividades volumétricas de etanol y formación de subproductos durante pruebas de fermentación de los prehidrolizados con las cepas original y adaptada de *S. cerevisiae* F12.

	200 °C – 5 min <sup>1</sup>					
	4% (p/p) de RSI		6% (p/p) de RSI		8% (p/p) de RSI	
	original	adaptada	original	adaptada	original	adaptada
<b>XILITOL</b> <sub>140h</sub> (g/l)	2,40	4,34	0,90	2,12	-	-
<b>GLICEROL</b> <sub>140h</sub> (g/l)	0,80	1,05	0,87	1,06	0,18	0,78
<b>ETANOL</b> <sub>140h</sub> (g/l)	10,88	13,11	7,54	8,60	4,08	7,40
<b>Q</b> <sub>EtOH24h</sub> (g/lh)	0,21	0,24	0,17	0,21	0,10	0,20
<b>Q</b> <sub>EtOH48h</sub> (g/lh)	0,15	0,18	0,11	0,13	<0,1	0,12
<b>Y</b> <sub>EtOH/AC</sub> <sup>3</sup>	0,30	0,30	0,29	0,29	0,23	0,25
	210 °C – 5 min <sup>2</sup>					
	4% (p/p) de RSI		6% (p/p) de RSI		8% (p/p) de RSI	
	original	adaptada	original	adaptada	original	adaptada
<b>XILITOL</b> <sub>140h</sub> (g/l)	0,49	2,12	0,49	1,29	-	-
<b>GLICEROL</b> <sub>140h</sub> (g/l)	0,70	1,05	0,88	1,09	0,16	1,10
<b>ETANOL</b> <sub>140h</sub> (g/l)	7,87	11,84	5,98	9,23	4,00	5,09
<b>Q</b> <sub>EtOH24h</sub> (g/lh)	0,20	0,26	0,19	0,24	0,10	0,12
<b>Q</b> <sub>EtOH48h</sub> (g/lh)	0,12	0,17	0,11	0,16	<0,1	<0,1
<b>Y</b> <sub>EtOH/AC</sub> <sup>3</sup>	0,37	0,37	0,36	0,39	0,36	0,25

<sup>1</sup> Prehidrolizado correspondiente a un MPC con 16,6% de RSI y diluido con agua destilada hasta 4%, 6% and 8% (p/p) de RSI.

<sup>2</sup> Prehidrolizado correspondiente a un MPC con 15,2% de RSI y diluido con agua destilada hasta 4%, 6% and 8% (p/p) de RSI.

<sup>3</sup> Rendimiento en etanol basado en gramos de azúcares consumidos (glucosa y xilosa) a las 140 h.

Como se observa en la tabla 4.6 la cepa adaptada produjo mayores concentraciones de glicerol, indicando con ello un mayor crecimiento celular directamente relacionado con una mayor tolerancia a los tóxicos ya que éstos inhiben también el crecimiento celular (Almeida y col., 2007). El glicerol es un metabolito primario que se produce durante el crecimiento anaeróbico para mantener el balance redox citosólico (Bakker y col., 2001). La conversión anaeróbica de la glucosa al etanol con *S. cerevisiae* tiene balance redox neutro ya que el NAD<sup>+</sup> es regenerado cuando se produce el etanol. No obstante, durante la síntesis de material celular este balance

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

neutro se ve afectado debido a que el NADH no puede ser regenerado a NAD<sup>+</sup>. La síntesis de glicerol mantiene un balance redox favorable ya que convierte el exceso de NADH, el cual se genera durante la formación de biomasa, a NAD<sup>+</sup> (Nissen y col., 1997). Es por ello que durante la fermentación la cinética de producción de glicerol coincide con la del consumo de glucosa y formación de biomasa (Zaldívar y col., 2005). El rendimiento de glicerol sobre glucosa en un crecimiento anaeróbico de *S. cerevisiae* es relativamente bajo (0,1 g/g) (Nissen y col., 1997; Sonderegger y col., 2004).

A pesar del considerable consumo de xilosa, en las pruebas de fermentabilidad con los prehidrolizados se detectaron concentraciones de xilitol muy bajas (tabla 4.6). Esto indica que en la fermentación del prehidrolizado se favorecen las reacciones redox que ayudan a mantener el desequilibrio que resulta de la fermentación de la xilosa en las levaduras con la ruta XR/XDH. Del mismo modo que ocurrió en el **artículo I** al ser fermentado el prehidrolizado por la cepa parental de *S. cerevisiae* F12, algunas sustancias como las cetonas o aldehídos actúan como aceptores de electrones implicando una reducción de la formación de xilitol, aportando el NAD<sup>+</sup> necesario para la reacción de la XDH y redirigiendo la formación de producto hacia el etanol a expensas de la síntesis de xilitol (Wahlbom y Hahn-Hägerdal, 2002).

Los inhibidores generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica reducen la conversión, tanto de la glucosa como de la xilosa, en procesos de fermentación y disminuyen las productividades volumétricas de etanol (Helle y col., 2003; Panagiotou y Olsson, 2007). No obstante, la adaptación por evolución se ha mostrado como una estrategia efectiva para aumentar la eficacia del consumo y fermentación de los azúcares lo que se reflejará en mayores concentraciones finales y productividades volumétricas de etanol (Keating y col., 2006; Martin y col., 2007).

Aunque la cepa parental de *S. cerevisiae* F12 se había mostrado con anterioridad altamente tolerante a los productos inhibidores presentes en los prehidrolizados lignocelulósicos (Panagiotou y Olsson, 2007; Sonderegger y col., 2004), la adaptación de la cepa originó una población con mayor tolerancia a los tóxicos, mayor tasa de consumo de azúcares y mayores rendimientos y productividades volumétricas de etanol en comparación con la cepa original.

##### **4.5.2. Empleo de la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12 en procesos de SCFS en semicontinuo con el MPC**

Como se ha comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, para que el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa sea eficiente son necesarias altas concentraciones de sólidos iniciales junto con una eficaz integración de las etapas de proceso. En ese contexto, el mayor nivel de integración de proceso sería emplear el MPC en un proceso de SCFS. Para ello es necesaria la utilización de una levadura capaz de fermentar tanto la glucosa como la xilosa y que presente elevada tolerancia a los productos tóxicos originados en el pretratamiento.

La energía necesaria para la etapa de destilación es dependiente de la concentración de etanol. Para alcanzar concentraciones de etanol del 4% (p/p), considerado punto de referencia para una destilación viable económicamente (Wingren y col., 2003), se requieren cargas de sustrato elevadas. El empleo de altas cargas de sustrato lleva asociado problemas de fluidez del medio que impiden una distribución uniforme de las levaduras y las enzimas, así como buen control del pH y la temperatura. Para minimizar estos problemas pueden realizarse etapas previas como la presacarificación o configuraciones de proceso en las que se añade el sustrato por pulsos (semicontinuo). Si la SCFS se desarrolla de un modo semicontinuo las concentraciones de glucosa a lo largo del proceso se mantienen en niveles bajos, previniéndose así la competencia de la glucosa y xilosa por los transportadores y favoreciéndose el consumo de la xilosa (Olofsson y col., 2008a).

Con objeto de alcanzar altas cargas de sustrato (11,25% p/p de sólidos insolubles) y estudiar el efecto sobre el consumo de xilosa de la adición de sustrato en semicontinuo, se plantearon diferentes procesos de SCFS en semicontinuo a partir de paja de trigo pretratada a 210 °C y 5 min. La carga inicial de sustrato fue MPC con un 6% (p/p) de sólidos insolubles y se añadieron diferentes cargas de sustrato hasta alcanzar los 11,25% (p/p). Al emplear el MPC como sustrato inicial estaban presentes en el medio también los productos tóxicos generados en el pretratamiento potencialmente inhibidores de las levaduras y las enzimas.

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

Como se comentó anteriormente, al emplear el prehidrolizado obtenido a 210 °C-5 min, concentraciones superiores a las correspondientes a 6% (p/p) de sólidos insolubles provocaron un significativo efecto inhibitorio sobre el consumo de azúcares (figuras 4.11 y 4.12) y producción de etanol (tabla 4.6). Para evitar esta inhibición se eligió una carga inicial de MPC del 6% de sólidos insolubles y para la adición de los pulsos de sustrato se empleó RSI lavado.

La cepa original *S. cerevisiae* F12 fue incapaz de fermentar este MPC al 6% (p/p). Sin embargo, como se observa en la tabla 4.6, esta misma cepa fue capaz de fermentar prehidrolizados a la misma concentración (6%). Estos resultados indican que para la misma concentración de productos tóxicos, el MPC tiene un efecto inhibitorio mayor que el prehidrolizado. Resultados similares fueron observados por otros autores a partir de madera de abeto, donde la levadura no era inhibida en fermentaciones del prehidrolizado correspondientes a 10% (p/p) de sólidos insolubles pero era totalmente inhibida con MPC con la misma carga de sustrato (Stenberg y col., 2000). Estudios con paja de cebada también mostraron buenos rendimientos de fermentación y crecimiento de *S. cerevisiae* en prehidrolizados correspondientes a 7,5% (p/p), mientras que la levadura era altamente inhibida al emplear el MPC a la misma carga de sólidos insolubles (Linde y col., 2007).

En el caso de la paja de trigo pretratada con EV a 220 °C y 2,5 min, se observó un efecto similar al emplear *K. marxianus* CECT 10875. Como se presenta en el **artículo IV**, *K. marxianus* CECT 10875 fue capaz de fermentar con buenos rendimientos prehidrolizados provenientes de material pretratado con 5% de sólidos insolubles pero no fue capaz de fermentar MPC con la misma carga de sustrato. El mayor efecto inhibitorio del MPC en comparación con el prehidrolizado no puede atribuirse a la baja disponibilidad de glucosa durante las primeras horas del proceso de SFS ya que tras 8 h de prehidrólisis se detectaron unos 5 g/l de glucosa disponibles para el microorganismo. La mayor inhibición al emplear el MPC podría deberse a que además de estar sometida a los productos de degradación, la presencia de sólidos insolubles en el MPC ejerce un efecto de fricción sobre la levadura que afecta su viabilidad. También podría sumarse el efecto inhibitorio de los conservantes añadidos para la estabilización del complejo enzimático.

En este contexto, la utilización de microorganismos adaptados a crecer en medios con productos tóxicos y alta carga de sólidos insolubles es especialmente necesaria cuando se emplea el MPC en procesos de SCFS. La cepa original de *S. cerevisiae* F12 no fue capaz de utilizar el MPC en el proceso de SCFS a las condiciones fijadas, sin embargo la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12 lo hizo con buenos rendimientos. Como se ha observado, la cepa evolucionada presenta más tolerancia a los tóxicos y un aprovechamiento más eficiente de la xilosa tras la adaptación.

En la figura 4.13 se muestra el proceso de SCFS en semicontinuo llevado a cabo con la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12. El proceso fue precedido por una etapa previa de prehidrólisis durante 3 h a 50 °C. En este caso la prehidrólisis fue más corta que en los experimentos anteriores debido a que la carga inicial de sustrato era más baja. La SCFS se desarrolló durante 140 h a 32 °C, con pH 5,0 y con una dosis de inóculo de 1 g/l. La carga de enzima fue de 15 UPF/g celulosa de celulasa (NS50013) y 15 UI/g celulosa de  $\beta$ -glucosidasa (NS50010). Con objeto de mantener una proporción constante de enzima y sustrato, junto con cada pulso de sustrato se añadió la dosis correspondiente de enzima. La adición de los pulsos de RSI lavado tuvo lugar a las 24 y 48 h.

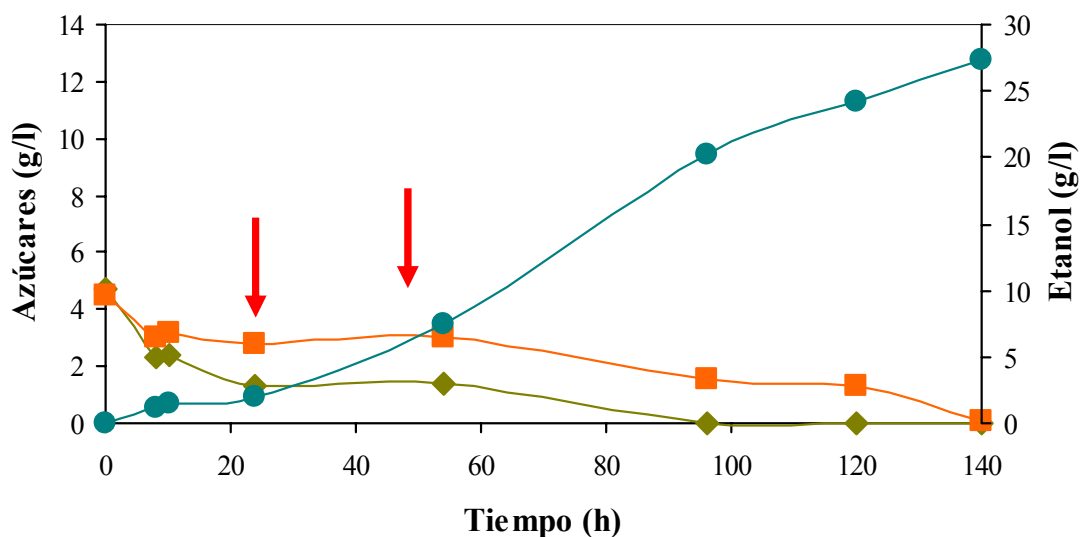


Figura 4.13. Proceso de SCFS en semicontinuo con la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12. Carga inicial de MPC (correspondiente a 6% p/p de sólidos insolubles) y adición de RSI lavado a las 24 y 48 h (flecha roja) hasta alcanzar una carga de sustrato de 11,25% p/p. Símbolos: (●) etanol; (◆) glucosa y (■) xilosa.

#### 4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

---

Como se observa en la figura 4.13, después de la prehidrólisis el medio contenía aproximadamente 5 g/l de glucosa y xilosa. Tras la adición de los dos pulsos de sustrato la glucosa libre en el medio fue consumida completamente a las 96 h de proceso mientras que la xilosa no se consumió en su totalidad hasta las 140 h. La producción máxima de etanol fue 27,4 g/l lo que correspondería a un rendimiento del 61% del teórico. Para calcular el porcentaje sobre el teórico se asumieron rendimientos de etanol sobre glucosa y xilosa del 0,51 g/g. No obstante, esta conversión del 0,51 g/g estaría sobrestimada ya que los rendimientos de etanol son sustancialmente menores para la xilosa que para la glucosa (Hahn-Hägerdal y col., 2007; Sonderegger y col., 2004).

Cabe destacar que en el proceso de SCFS con MPC (10% p/v) y la cepa original de *S. cerevisiae* F12 el rendimiento de etanol teniendo en cuenta la glucosa y la xilosa del material pretratado fue de 0,26 g/g, similar al observado por otros autores con la misma cepa (Hahn-Hägerdal y col., 2007; Olsson y col., 2006). No obstante, el rendimiento al emplear la cepa adaptada en un proceso de SCFS semicontinuo fue de 0,31 g/g. Este incremento del rendimiento se debe tanto a la utilización de una levadura cofermentadora de pentosas cuyo inóculo fue adaptado a los tóxicos con un mayor consumo de azúcares (tanto xilosa como glucosa) como a la realización del proceso de SCFS en semicontinuo.

A pesar de las mejoras que supone emplear el MPC en un proceso de SCFS con la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12, no ha sido posible superar la concentración de etanol (36,2 g/l) ni el rendimiento de SFS (0,33 g/g) obtenidos en el proceso de SFS en semicontinuo a 42 °C con *K. marxianus* CECT 10875 a partir del RSI. Así pues, es necesario seguir investigando con objeto de obtener levaduras recombinantes más robustas y resistentes a los tóxicos generados durante el pretratamiento, que presenten buenas capacidades fermentativas y permitan alcanzar mayores rendimientos globales en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación.

## **5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



## 5. CONCLUSIONES

1. La explosión por vapor (EV) es un método efectivo para alterar la estructura la paja de trigo favoreciendo la accesibilidad de las enzimas en la etapa de hidrólisis enzimática. El pretratamiento por EV provoca una solubilización parcial de la hemicelulosa y una concentración de la celulosa y la lignina en el RSI, cuya proporción depende de la severidad del pretratamiento y del tamaño de partícula empleado durante el mismo. Las condiciones de pretratamiento, que determinan la composición del material pretratado completo (MPC), deben elegirse de acuerdo al esquema de proceso seleccionado para las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación.
2. El proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) de paja de trigo pretratada a etanol permite obtener mayores productividades volumétricas de etanol y rendimientos globales que el proceso de etapas separadas.
3. La utilización de la levadura termotolerante *K. marxianus* CECT 10875 permite realizar el proceso de SFS a 42 °C, obteniéndose mejores rendimientos y productividades volumétricas de etanol que en el proceso de SFS a 32 °C con *S. cerevisiae* Red Star.
4. La cepa recombinante *S. cerevisiae* F12 es capaz de cofermentar la xilosa y la glucosa presentes en hidrolizados de la paja de trigo pretratada.
5. El empleo de *S. cerevisiae* F12 en un proceso de Sacarificación y Cofermentación Simultáneas (SCFS) con el MPC aumenta en un 30% la producción de etanol en comparación con los resultados obtenidos con la cepa fermentadora de glucosa *S. cerevisiae* Red Star.
6. La adaptación de la cepa recombinante *S. cerevisiae* F12 mediante ingeniería evolutiva origina una población con mayor tolerancia a los productos tóxicos y

mayor tasa de consumo de azúcares, lo que se traduce en mayores productividades volumétricas, rendimientos y concentraciones finales de etanol.

7. Los procesos de SFS/SCFS en semicontinuo aumentan los rendimientos y productividades volumétricas de etanol cuando se comparan con los procesos convencionales. El proceso semicontinuo, además de facilitar el manejo del material favoreciendo la fluidez del medio, disminuye la inhibición por producto final de la glucosa sobre las enzimas y favorece la cofermentación de la glucosa y la xilosa.
8. Los mejores resultados de producción de etanol se obtuvieron al utilizar *K. marxianus* CECT 10875 en un proceso de SFS semicontinuo a 42 °C. La concentración máxima de etanol fue de 36,2 g/l lo que significó un incremento de un 20% en la producción de etanol en comparación con la SFS convencional a las mismas condiciones.
9. La mayor integración de las etapas de proceso se consigue con el empleo de levaduras capaces de cofermentar la xilosa y la glucosa en procesos de SCFS con el MPC. No obstante, la mayor concentración y rendimiento de etanol se obtuvo empleando *K. marxianus* CECT 10875. Así pues, todavía es necesario seguir investigando con el fin de conseguir cepas recombinantes más robustas y con buenas capacidades fermentativas, con objeto de alcanzar mayor rendimiento global en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación.

## CONCLUSIONS

1. Steam explosion (SE) is an effective pretreatment method to alter wheat straw structure favouring the accessibility of cellulases in the enzymatic hydrolysis step. SE pretreatment causes partial solubilization of hemicellulose and cellulose and lignin concentration, which proportion depends on pretreatment severity as well as chip size employed. Pretreatment conditions, that determine slurry composition, must be chosen according to the process configuration selected for the following hydrolysis and fermentation steps.
2. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process of steam-exploded wheat straw for ethanol production enables to obtain higher ethanol volumetric productivity and overall yield than Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) process.
3. The employment of the thermotolerant yeast *K. marxianus* CECT 10875 makes possible to perform the SSF process at 42 °C, obtaining higher yields and ethanol volumetric productivity than in SSF process at 32 °C with *S. cerevisiae* Red Star.
4. Recombinant strain *S. cerevisiae* F12 is capable of co-fermenting the xylose and glucose present in prehydrolysates from steam-exploded wheat straw.
5. The use of *S. cerevisiae* F12 in a Simultaneous Saccharification and Co-fermentation process (SSCF) with the whole slurry results in a 30% increase of ethanol production in comparison with the glucose fermenting yeast *S. cerevisiae* Red Star.
6. Adaptation of the recombinant xylose-fermenting *S. cerevisiae* F12 to wheat straw prehydrolysates with increasing concentration of inhibitors results in an evolved population showing higher sugar consumption rates and higher ethanol concentration and productivities than the parental strain.

7. Fed-batch SSF/SSCF processes result in higher ethanol yield and productivity than batch SSF/SSCF. Fed-batch processes, besides making the mixture easier to handle, reduce end-product inhibition and favour glucose and xylose co-fermentation.
8. The best results regarding maximum ethanol concentration were obtained with *K. marxianus* CECT 10875 in fed-batch SSF process at 42 °C. Ethanol concentration was 36.2 g/L which meant 20% increase in the ethanol production when comparing with conventional SSF at the same conditions.
9. The highest level of process integration is reached with yeast strains able to co-ferment glucose and xylose in an SSCF process with the whole slurry. Notwithstanding, the highest ethanol concentration and yields were obtained with *K. marxianus* CECT 10875. Therefore, great efforts have still to be addressed to obtain robust recombinant strains with good fermenting capacities in order to improve the overall yield in a second generation bioethanol production process.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Aggarwal N.K., Nigam P., Singh D., Yadav B.S. (2001). Process optimization for the production of sugar for the bioethanol industry from Tapioca, a non-conventional source of starch. *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **17**, 783-787.
- Alfani A., Gallifuoco F., Saporosi A., Spera A., Cantarella M. (2000). Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **25**, 184-192.
- Allen S.G., Schulman D., Lichwa J., Antal M.J. (2001). A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial Engineering and Chemistry Research* **40**, 2934-2941.
- Almeida J.R.M. y Hahn-Hägerdal B. (2009). Developing *Saccharomyces cerevisiae* strains for second generation bioethanol: *Improving xylose fermentation and inhibitor tolerance*. *International Sugar Journal* **111**, 172-180.
- Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hahn-Hägerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M.F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**, 340-349.
- Aristidou A. y Penttila M. (2000). Metabolic engineering application to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 187-198.
- Avellar B.K. y Glasser W.G. (1998). Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass and Bioenergy* **14**, 205-218
- Bakker B.M., Overkamp K.M., Van Maris A.J.A., Kottler P., Luttik M.A.H., Van Dijken J.P, Pronk J.T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 15-37.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Carrasco J., Cabañas, A., Navarro, A.A., Ballesteros M. (1998). Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **70-72**, 369-381.
- Ballesteros, I. (2000). Obtencion de Etanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS). Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Navarro A.A., González A., Carrasco J., Ballesteros M. (2000). Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-86**, 97-110.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Sáez F., Ballesteros M. (2001). Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91-93**, 237-252.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M. (2002a). Simultaneous saccharification and fermentation process for converting the cellulosic fraction of olive oil extraction residue into ethanol. *Grasas y Aceites* **53**, 282-288.

Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M. (2002b). Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry* **38**, 187-192.

Ballesteros I., Negro M.J., Oliva J.M., Cabañas A., Manzanares P., Ballesteros M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1-3**, 496-508.

Ballesteros M. (2001). Biocombustibles para el transporte. En: Tecnologías Energéticas e Impacto Ambiental." JEN-CIEMAT, Mc Graw-Hill, Madrid, 357-369.

Ballesteros M., Oliva J.M., Manzanares P., Negro M.J., Ballesteros, I. (2002). Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**, 559-561.

Ballesteros M., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* **39**, 1843-1848.

Ballesteros M. (2006). Carburantes sin petroleo: Bioetanol. *Investigación y Ciencia* **362**, 78-85.

Bamaga O., Thakur M., Verma M. (2003). Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America* **34**, 53-58.

Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., Mc Hale A.P. (1998). Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeast in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 809-821.

Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Maximenko V., Bura R., Markov A., Sinitsyn A. Okunev O., Solovieva I., Saddler J.N. (2006). Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129-132**, 528-545.

Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Markov A., Okunev O., Gusarov A., Maximenko V., Gregg D., Saddler J. (2005). Evaluation of novel fungal cellulase preparation for ability to hydrolyze softwood substrate-evidence of the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* **37**, 175-184.

BioPlat. Plataforma Tecnológica Española de la Biomasa. (2009). Documento de Visión a 2030.

Blanco M.I. y Azqueta D. (2008). Can the environmental benefits of biomass support agriculture? The case of cereals for electricity and bioethanol production in Northern Spain. *Energy Policy* **36**, 357-366.

Bollók M., Réczey K., Zacchi G. (2000). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-86**, 69-80.

- Bothast R.J. y Schlicher M.A. (2005). Biotechnological process for conversion of corn into ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **67**, 19-25.
- Brown R.M. (2003). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 2st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**, 487-495.
- Brownell H.H. y Saddler J.N. (1984). Steam-explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **14**, 54-68.
- Buranov A.U. y Mazza G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* **28**, 237-259.
- Çakar Z.P., Seker U.O.S., Tamerler C., Sonderegger M., Sauer U. (2005). Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **5**, 569-578.
- Cantarella M., Cantarella L., Gallifuoco A., Spera A., Alfani F. (2004). Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry* **39**, 1533-1542.
- Cara C., Romero I., Oliva J.M., Sáez F., Castro E. (2007). Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **137-140**, 379-394.
- Cara C., Ruiz E., Ballesteros I., Negro M.J., Castro E. (2006). Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* **41**, 423-429.
- Cardona C.A. y Sánchez O.J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* **98**, 2415-2457.
- Chatterjee R. y Yuan L. (2006). Directed evolution of metabolic pathways. *Trends in Biotechnology* **24**, 28-38.
- Chu B.C.H. y Lee H. (2007). Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances* **25**, 425-441.
- Dahlman O., Jacobs A., Sjoberg J. (2003). Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose* **10**, 325-334.
- Demain A.L., Newcomb M., Wu J.H.D. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 124-154.
- Devantier R., Pedersen S., Olsson L. (2005). Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **68**, 622-629.
- DOE. U.S. (2006). Department of Energy. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol. A Joint Research Agenda. A research roadmap resulting from the biomass to biofuels workshop DOE/SC-0095.

- Doran-Peterson J., Cook D.M., Brandon S.K. (2008). Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. *Plant Journal* **54**, 582-592.
- Duff S.J.B. y Murray W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* **55**, 1-33.
- Eliasson A., Christensson C., Wahlbom F., Hahn-Hägerdal B. (2000). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3381-3386.
- Esteghlalian A., Bilodeau M., Mansfield S.D., Saddler J.N. (2001). Do enzymatic hydrolyzability and Simons' strain reflect the changes in the accessibility of lignocellulose substrates to cellulase enzymes? *Biotechnology Progress* **17**, 1049-1054.
- Evers A.D., Blakeney A.B., O'Brien L. (1999). Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 629-650.
- FAOSTAT (2007). Food and Agricultural Organization (FAO). Available at <http://apps.fao.org/>
- Fengel D. y Wegener G. (1989). Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Berlin-New York: Walter de Gruyter.
- Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **79**, 339-354.
- Galbe M. Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **59**, 609-617.
- García-Aparicio M.P., Ballesteros I., González A., Oliva J.M., Ballesteros M., Negro M.J. (2006). Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129**, 278-288.
- García-Aparicio M.P., Ballesteros M., Manzanares P., Ballesteros I., González A., Negro, M.J. (2007). Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136-140**, 353-365.
- Glasser W.G. y Wright R.S. (1998). Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass and Bioenergy* **14**, 219-235.
- Golias H., Dumsday G.J., Stanley G.A., Pamment N.B. (2000). Characteristics of cellulase preparations affecting the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Biotechnology Letters* **22**, 617-621.
- Golias H., Dumsday G.J., Stanley G.A., Pamment N.B. (2002). Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology* **96**, 155-168.

- Gómez L.D., Steele-King, C.G., Mc Queen-Mason S.J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls. *New Phytologist* **178**, 473-485.
- Gray K.A., Zhao L., Emptage M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* **10**, 141-146.
- Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., Spencer-Martins I., Gorwa-Grauslund M.F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **74**, 937-953.
- Hahn-Hägerdal B., Jeppsson H., Skoog, K., Prior B.A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 933-943.
- Hamacher T., Becker J., Gardonyi M., Hahn-Hägerdal B., Boles E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **148**, 2783-2788.
- Hayn M., Steiner W., Klinger R., Steinmüller H., Sinner M., Esterbauer H. (1993). Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. En: Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Saddler JN (Ed.), CAB International, Wallingford, UK; 33-72.
- Helle S., Cameron D., Lam J., White B., Duff S. (2003). Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineering strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 786-792.
- Hendriks A.T.W.M. y Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **100**, 10-18.
- Higuchi, T. (1990). Lignin Biochemistry - Biosynthesis and Biodegradation. *Wood Science and Technology* **24**, 23-63.
- Himmel M.E., Adney W.S., Baker J.O., Elander R., Mc Millan J.D., Nieves R.A. Sheehan J.J., Thomas S.R., Vinzant T.B., Zhang M. (1997). Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective. *Fuels and Chemicals for Biomass. ACS Symposium Series* **666**, 2-45
- Howard R.L., Abotsi E., Rensburg J., Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2**, 602-619.
- Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A. (1990). Phenolic-Acid Bridges Between Polysaccharides and Lignin in Wheat Internodes. *Phytochemistry* **29**, 733-737.
- Ingram L.O., Gómez P.F., Moniruzzaman M., Wood B.E., Yomano L.P., York S.W. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 205-214.
- Jeffries T.W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 320-326.
- Jeppsson M., Johansson B., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. (2002). Reduced Oxidative Pentose Phosphate Pathway Flux in Recombinant Xylose-Utilizing

*Saccharomyces cerevisiae* Strains Improves the Ethanol Yield from Xylose. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1604-1609.

Johansson B., Christensson, C., Hobbey T., Hahn-Hägerdal B. (2001). Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4249-4255.

Jørgensen, H., Kristensen, J.B Felby C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **1**, 119-134.

Kádár Z., Szengyel Z., Réczey, K. (2004). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crop and Products* **20**, 103-110.

Karhumaa K., Sánchez, R.G., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* **6**, 5.

Katahira S., Ito M., Takema H., Fujita Y., Tanino T., Tanaka T., Fukuda H., Kondo A. (2008). Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter *Sut1*. *Enzyme and Microbial Technology* **43**, 115-119.

Keating J.D., Panganiban C., Mansfield S.D. (2006). Tolerance and adaptation of ethanologenic yeast to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnology and Bioengineering* **93**, 1196-1206.

Kim S. y Holtzapfle, M.T. (2005). Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* **96**, 1994-2006.

Kim S. y Dale B.E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* **26**, 361-375.

Kim T.H., Taylor F., Hicks K.B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology* **99**, 5694-5702.

Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **66**, 10-26.

Klinke H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S., Thomsen A.B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* **82**, 15-26.

Kristensen J.B., Thygesen L.G., Felby C., Jørgensen H., Elder T. (2008). Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels* **1**, 5.

- Lam T.B.T., Kadoya K., Iiyama K. (2001). Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. *Phytochemistry* **57**, 987-992.
- Laopaiboon L., Thanonkeo P., Jaisil P., Laopaiboon P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 1497-1501.
- Larsson S., Quintana S., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jonsson, L.J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-86**, 617-632.
- Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J., Antal M.J., Lynd L.R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagase for conversion to ethanol. *Bioresource Technology* **81**, 33-44.
- Lechón Y., Cabal H., Lago C., De la Rúa C., Sáez R., Fernández M. (2005). Análisis de Ciclo de Vida de Combustibles alternativos para el transporte. Fase I. Análisis del Ciclo de Vida Comparativo de Etanol de Cereales y de la Gasolina. Energía y Cambio Climático. Ministerio de Medio Ambiente. Ministerio de Educación y Ciencia. ISBN.84-8320-312-X.
- Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* **98**, 3367-3374.
- Linde M., Galbe M., Zacchi G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loading and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1100-1107.
- Liu Z.L., Slininger P.J., Dien B.S., Berhow M.A., Kurtzman C.P., Gorsich S.W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **31**, 345-352.
- Liu Z.L., Slininger P.J., Gorsich S.W. (2005). Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124**, 451-460.
- Lynd L.R. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment* **21**, 403-465.
- Lynd L.R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., Pretorius I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 506-577.
- Lynd L.R., Van Zyl W.H., Mc Bride J.E., Laser M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 577-583.
- Margeot A., Hahn-Hägerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 372-380.

- Martin C., Galbe M., Wahlbom C.F., Hahn-Hägerdal B., Jonsson L.J. (2002). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 274-282.
- Martin C., Marcet M., Almazan O., Jonsson L.J. (2007). Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology* **98**, 1767-1773.
- Matsushika A., Inoue H., Kodaki T., Sawayama S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**, 37-53.
- McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1). Overview of biomass. *Bioresource Technology* **83**, 37-46.
- Medve J., Karlsson J., Lee D., Tjerneld F. (1998). Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* **59**, 621-634.
- Meinander, N.Q., Hahn-Hägerdal B. (1997). Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant, *XLI*-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of different sugars and ethanol as cosubstrates. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1959-1964.
- Meinander N.Q., Boels I., Hahn-Hägerdal, B. (1999). Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *XYL1* and *XYL2* from *Pichia stipitis* with and without overexpression of *TAL1*. *Bioresource Technology* **68**, 79-87.
- Mishima D., Kuniki M., Sei K., Soda S., Ike M., Fujita M. (2008). Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Bioresource Technology* **99**, 2495-2500.
- Mosier N., Wyman C.E., Dale B.D., Elander R.T., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch C.M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **96**, 673-686.
- Mussatto S.I. y Roberto I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative process: a review. *Bioresource Technology* **93**, 1-10.
- Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J.M., Cabañas A., Ballesteros, M. (2003). Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105**, 87-100.
- Nissen T.L., Schulze U., Nielsen J., Villadsen J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 203-218.
- Nobles D.R., Romanovicz D.K., Brown R.M. (2001). Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiology* **127**, 529-542.

- NREL (2007). National Renewable Energy Laboratory. Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. Golden. CO.
- Öhgren K., Galbe, M., y Zacchi, G. (2005). Optimization of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated corn stover for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**, 1055-1067.
- Öhgren K., Rudolf A., Galbe M., Zacchi G. (2006a). Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy* **30**, 863-869.
- Öhgren, K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi G. (2006b). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* **126**, 488-498.
- Öhgren K., Vehmaanpera J., Siika-aho M., Galbe M., Viikari L., Zacchi, G. (2007). High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 607-613.
- Okuda N., Ninomiya K., Takao M., Katakura Y., Shioya S. (2007). Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103**, 350-357.
- Olanders B. y Steenari B.M. (1995). Characterization of ashes from wood and straw. *Biomass and Bioenergy* **8**, 105-115.
- Oliva J.M., Sáez F., Ballesteros I., González A., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros, M. (2003). Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105**, 141-154.
- Olofsson K., Rudolf A., Lidén G. (2008a). Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **134**, 112-120.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., and Lidén, G. (2008b). A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Fuel* **1:7**, 1-14.
- Olsson L. y Nielsen J. (2000). The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 785-792.
- Olsson L., Jørgensen H., Krogh K.B.R., Roca, C. (2005). Bioethanol production from lignocellulosic material. En: Polysaccharides structural diversity and functional versatility, S. Dimitriu, (Ed.), Marcel Dekker, New York, 957-993.
- Olsson L., Sørensen H.R., Dam B.P., Christensen H., Krogh K.M., Meyer A.S. (2006). Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129-132**, 117-129.

- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Zacchi, G. (1996). The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 470-476.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., Réczey K. (1997). Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology* **20**, 286-293.
- Palmqvist E. y Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology* **74**, 25-33.
- Palonen, H. (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Tesis Doctoral. <http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>
- Pan X., Zhang X., Gregg D.J., Saddler J.N. (2004). Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **115**, 1103-1114.
- Panagiotou G. y Olsson L. (2007). Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rate. *Biotechnology and Bioengineering* **96**, 250-258.
- Patle S. y Lal B. (2008). Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* **32**, 596-602.
- PER (2005). Plan de Energías Renovables 2005-2010. IDEA. Ministerio de Industria, Comercio y Turismo.
- Pérez, J.A., González A., Oliva J.M., Ballesteros I., Manzanares P. (2007). Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**, 929-938.
- Pérez J.A., Ballesteros I., Ballesteros M., Sáez, F., Negro M.J., Manzanares P. (2008). Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel* **87**, 3640-3647.
- QTEROS. (2009). <http://www.qteros.com/technology/qmicrobe/>.
- Ramos L.P., Breuil C., Kushner D.J., Saddler J.N. (1992). Steam pretreatment conditions for effective enzymic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung* **46**, 149-154.
- Rosgaard L., Andric P., Dam-Johansen K., Pedersen S., Meyer A.S. (2007). Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **143**, 27-40.
- Rudolf A., Alkasrawi M., Zacchi G., Lidén G. (2005). A comparison between batch and fed-bach simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology* **37**, 195-204.

- Ruiz E., Cara C., Ballesteros M., Manzanares P., Ballesteros I., Castro E. (2006). Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **130**, 631-643.
- Runquist D., Fonseca C., Radstrom P., Spencer-Martins I., Hahn-Hägerdal B. (2009). Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **82**, 123-130.
- Saha B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**, 279-291.
- Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., Wu Y.V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry* **40**, 3693-3700.
- Saloheimo A., Rauta J., Stasyk O.V., Sibirny A.A., Penttila M., Ruohonen L. (2007). Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **74**, 1041-1052.
- Saloheimo M., Kuja-Panula J., Ylosmaki E., Ward M., Penttila M. (2002). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* glucosidase BGLII (Cel1A). *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4546-4553.
- Sánchez O.J. y Cardona C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* **99**, 5270-5295.
- Sassner P., Galbe M., Zacchi G. (2006). Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 756-762.
- Sauer U. (2001). Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **73**, 129-169.
- Sedlack M. y Ho N.W. (2004). Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of cofermenting glucose and xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **114**, 403-416.
- Shi N.Q. y Jeffries T.W. (1998). Anaerobic growth and improved fermentation of *Pichia stipitis* bearing a URA1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **50**, 339-345.
- Sims R, Taylor M, Saddler J., Mabee W.E. (2008). From 1st to 2nd generation biofuel technologies: An overview of current industry and RD&D activities. International Energy Agency.
- Soderstrom J., Pilcher L., Galbe M., Zacchi G. (2003). Two-step steam pretreatment of softwood by diluted H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* **24**, 475-486.
- Solomon B.D., Barnes J.R., Halvorsen K.E. (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy* **31**, 416-425.

- Sonderegger M. y Sauer U. (2003). Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1990-1998.
- Sonderegger M., Jeppsson H., Larsson C., Gorwa-Grauslund M.F., Boles E., Olsson L., Spencer-Martins I., Hahn-Hägerdal B., Sauer U. (2004). Fermentation performance of engineered and evolve xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering* **87**, 90-98.
- Sørensen, H.R., Pedersen S., Viksø-Nielsen A., Meyer, A.S. (2005). Efficiencies of designed enzyme combinations in realising arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme and Microbial Technology* **36**, 773-784.
- Souto-Maior A.M., Runquist D., Hahn-Hägerdal, B. (2009). Crabtree-negative characteristics of recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **143**, 119-123.
- Stenberg K., Bollók M., Réczey K., Galbe M., Zacchi G. (2000). Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering* **68**, 205-210.
- Sun R.C., Fang J.M., Rowlands P., Bolton J. (1998). Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **46**, 2804-2809.
- Sun R.C., Tomkinson J., Wang Y.X., Xiao B. (2000). Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. *Polymer* **41**, 2647-2656.
- Sun R.C. y Tomkinson, J. (2003). Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pretreated wheat straw. *European Polymer Journal* **39**, 751-759.
- Sun Y. y Cheng J.Y. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **83**, 1-11.
- Suryawati L., Wilkins M.R., Bellmer D.D., Huhnke R.L., Maness, N.O., Banat I.M. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow Switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering* **101**, 894-902.
- Szczodrak J. y Targonski Z. (1987). Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* **31**, 300-303.
- Taherzadeh M.J., Niklasson C., Lidén, G. (2000a). On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. *Biotechnology and Bioengineering* **69**, 330-338.
- Taherzadeh M.J., Gustafsson L., Niklasson C., Lidén G. (2000b). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **53**, 701-708.

- Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. (2001). Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam pretreated softwood. *Biotechnology Progress* **17**, 110-117.
- Tengerdy R.P. y Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **13**, 169-179.
- Teymouri F., Laureano-Pérez L., Alizadeh, H., Dale B.D. (2005). Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* **96**, 2014-2018.
- Van Vleet J.H. y Jeffries T.W. (2009). Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 300-306.
- Van Walsum G.P., Allen S.G., Spenser M.J., Laser M.S., Antal M.J., Lynd, L.R. (1996). Conversion of lignocelulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**, 157-170.
- Van Zyl W.H., Lynd L.R., Den Haan R., Mc Bride J.E. (2007). Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels* **108** 205-235.
- Varga E., Klinke H.B., Réczey K., Thomsen A.B. (2004). High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* **88**, 567-574.
- Wahlbom C.F. y Hahn Hägerdal B. (2002). Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **78**, 172-178.
- Wahlbom C.F., Van Zyl W.H., Jonsson, L.J., Hahn-Hägerdal B., Otero, R.R.C. (2003). Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitidis* CBS 6054. *FEMS Yeast Research* **3**, 319-326.
- Wang S., Ingledew W.M., Thomas K.C., Sosulski K., Sosulski F.W. (1999a). Optimization of fermentation temperature and mash specific gravity for fuel alcohol production. *Cereal Chemistry* **76**, 82-86.
- Wang S., Thomas K.C., Sosulski K., Ingledew W.M., Sosulski F.W. (1999b). Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process Biochemistry* **34**, 421-428.
- Wang Z., Chen M., Xu Y., Li S., Lu W., Ping S., Zhang W., Lin M. (2008). An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis pdc* and *adhB* genes for enhanced ethanol production from xylose. *Biotechnology Letters* **30**, 657-663.
- Warnick T.A., Methe B.A., Leschine S.B. (2002). *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1155-1160.
- Wheals A.E., Basso L.C., Alves D.M.G., Amorim H.V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* **17**, 482-487.

Wingren A., Galbe M., Zacchi, G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress* **19**, 1109-1117.

Wouter Wisselink H., Toirkens M.J., Wu Q., Pronk J.T., Van Maris A.J.A. (2009). Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 907-914.

Wyman C.E. (1996). Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington.

Wyman C.E. (1999). Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment* **24**, 189-226.

Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* **96**, 1959-1966.

Xiao Z., Zhang X., Greff D.J., Saddler J.N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113-116**, 1115-1126.

Yue Z., Bin W., Baixu Y., Peiji, G. (2004). Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science in China series C: Life Science* **47**, 18-24.

Zaldívar J., Borges A., Johansson B., Smits H.P., Villas-Boas S.G., Nielsen J., Olsson L. (2002). Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **59**, 436-442.

Zaldívar J., Roca C., Le Foll C., Hahn-Hägerdal B., Olsson, L. (2005). Ethanolic fermentation of acid-treated starch industry effluents by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Bioresource Technology* **96**, 1670-1676.

Zhan X., Wang D., Tuinstra M.R., Bean S., Seib P.A., Sun X.S. (2003). Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location. *Industrial Crops and Products* **18**, 245-255.

Zhang H.Y. y Lynd L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* **88**, 797-779.

Zogaj X., Nimt M., Rohde M., Bokranz W., Romling U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology* **39**, 1452-1463.